

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universität Rostock

**Untersuchungen zum Einfluss eines *Linum usitatissimum*-
Wurzelextrakts auf zwei verschiedene Mammakarzinom-
Zelllinien im Vergleich mit Genistein, Genistin, Daidzein,
Daidzin, Secoisolariciresinol, Tamoxifen und 17 β -Estradiol**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Conrad Alexander Theil

geb. in Stuttgart

Rostock

November 2010

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Volker Briesse, Universitätsfrauenklinik Rostock am Klinikum Südstadt, Südring 81, 18059 Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Birgit Piechulla, Institut für Biowissenschaften Universität Rostock, Albert-Einstein-Strasse 3, 18059 Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Udo Jeschke, Klinikum der Universität München, Campus Innenstadt, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Maistrasse 11, 80337 München

verteidigt am 12.07.2011 in Rostock

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Mammakarzinom	12
1.1.1. Epidemiologie	12
1.1.2. Geographische Unterschiede	13
1.1.3. Ätiologie und Einteilung	15
1.1.4. Pathogenese und Molekularpathologie	16
1.2. Pflanzenwirkstoffe	17
1.2.1. Sekundäre Pflanzenwirkstoffe	17
1.2.2. Phytopharmaka	17
1.2.3. Der Lein (<i>Linum usitatissimum</i>)	18
1.3. Steroidale Hormone	21
1.3.1. Definition	21
1.3.2. Estrogene	21
1.3.3. Der Estrogenrezeptor - molekulare Wirkmechanismen	22
1.3.4. Selektive Estrogen Rezeptor Modulatoren (SERMs)	24
1.4. Phytoestrogene	25
1.4.1. Historischer Hintergrund	25
1.4.2. Überblick	26
1.4.3. Isoflavone und Lignane	27
1.4.4. Metabolismus	29
1.4.5. Biologische Wirkungen	32
1.4.6. Klinische Wirkungen	34

2. Zielstellung der Arbeit 36

3. Material und Methoden

3.1. Pflanzenextrakt	38
3.1.1. Pflanzenmaterial	38
3.1.2. Extraktion nach Luyengi et al. (1996)	38
3.1.3. Aufarbeitung des Extrakts	39
3.2. Phytoestrogene und Kontrollsubstanzen	40
3.2.1. Isoflavone und Lignane	40
3.2.2. Tamoxifen und 17 β -Estradiol	40
3.2.3. Aufarbeitung der Phytoestrogene und Kontrollsubstanzen	40

3.3. Zellkulturen	40
3.3.1. Mammakarzinom-Zelllinien	40
3.3.2. Zellkulturmedien	41
3.3.3. Zellkultivierung	41
3.3.4. Ermittlung der Lebendzellzahl	42
3.4. Testverfahren	44
3.4.1. Testvorbereitungen und -konditionen	44
3.4.2. LDH-Zytotoxizitätstest	45
3.4.3. MTT-Zellvitalitäts/-proliferationstest	47
3.4.4. BrdU-Zellproliferationstest	49
3.5. Immunhistochemie	50
3.6. Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie	51
3.7. Statistische Auswertung	53
3.8. Chemikalien und Materialien	54
 4. Ergebnisse	
4.1. Testverfahren	57
4.1.1. LDH-Zytotoxizitätstests	57
4.1.1.1. MCF-7	57
4.1.1.2. BT20	59
4.1.2. MTT-Zellvitalitäts/-proliferationstests	61
4.1.2.1. MCF-7	61
4.1.2.2. BT20	63
4.1.3. BrdU-Zellproliferationstests	65
4.1.3.1. MCF-7	65
4.1.3.2. BT20	67
4.2. Immunhistochemie	69
4.3. Massenspektrometrie	70
 5. Diskussion	
5.1. Relevante Wirkungen - Vergleich zwischen den Zelllinien	72
5.1.1. <i>Linum usitatissimum</i> -Wurzelextrakt	72
5.1.2. Phytoestrogene	74
5.1.3. Kontrollsubstanzen	75
5.2. Interpretation der Ergebnisse	77
5.2.1. Expression der Hormonrezeptoren	77

5.2.2. Beteiligung der Hormonrezeptoren an den Wirkungen	78
5.2.3. Wirkungen der Phytoestrogene	79
5.2.4. Wirkungen der Kontrollsubstanzen	81
5.2.5. Rolle der Phytoestrogene in den Wirkungen des Wurzelextrakts	83
5.2.6. Mögliche Wirkstoffe des <i>Linum usitatissimum</i> -Wurzelextrakts	83
6. Zusammenfassung	85
7. Ausblick	87
8. Literaturverzeichnis	89
9. Thesen	101
10. Anhang	103
11. Danksagung	104
12. Selbständigkeitserklärung	105
13. Publikationen	106

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2006 [*Robert Koch-Institut, 2010*]
- Abb. 2:** Jährliche Neuerkrankungs- und Sterbefälle sowie altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten des Mammakarzinoms (Europastandard), Deutschland 1980 – 2004, ICD-10 C50 [*Robert Koch-Institut, 2010*]
- Abb. 3:** Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten in Deutschland im internationalen Vergleich 2006, ICD-10 C50 (außer Frankreich, Australien: 2005, Schweiz: 2003-2006, Belgien Sterberaten: 2004), *Fälle pro 100.000* [*Robert Koch-Institut, 2010*]
- Abb. 4:** Leinfeld zur Blütezeit (Belgien), Blüte, Samenkapseln
- Abb. 5:** Schematischer Aufbau des Estrogenrezeptors
- Abb. 6:** Schematische Darstellung der ER-vermittelten Signaltransduktion
- Abb. 7:** Strukturformeln von Tamoxifen und Fulvestrant (Faslodex®)
- Abb. 8:** Strukturelle Ähnlichkeit von Estrogenen und Phytoestrogenen (hier: das Isoflavon Equol) [*Setchell KD et al., 1999*]
- Abb. 9:** Isoflavon-Aglykone der wichtigsten Isoflavone [*Kulling SE et al., 2003*]
- Abb. 10:** Phenylpropan als Strukturelement (links); (+)-Secoisolariciresinol (rechts)
- Abb. 11:** Umwandlung von Lignan in „Säugerlignane“
- Abb. 12:** Leinwurzelmaterial, Methanolextraktion im Wasserbad, Einengung des Extrakts am Rotationsverdampfer
- Abb. 13:** Lichtmikroskopische Nativbilder der Zelllinien MCF-7 und BT20 in Zellkultur (100-fache Vergrößerung)
- Abb. 14:** Bürker-Zählkammer, Ausschnitt des Zählnetzes unter dem Mikroskop
- Abb. 15:** 96-Wellplatte, beimpft mit Zellsuspension (Zellen + Nährmedium)
- Abb. 16:** Chemische Reaktionen des LDH-Tests
- Abb. 17:** Chemische Reaktion des MTT-Tests
- Abb. 18:** Prinzip des BrdU-Tests: Einbau von BrdU anstelle von Thymidin in die DNA
- Abb. 19:** Massenspektrometer (Finnigan MAT 900)
- Abb. 20:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 (LDH-Test)
- Abb. 21:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen der Phytoestrogene auf MCF-7 (LDH-Test)
- Abb. 22:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen der Kontrollsubstanzen auf MCF-7 (LDH-Test)
- Abb. 23:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextrakts auf BT20 (LDH-Test)

- Abb. 24:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen der Phytoestrogene auf BT20 (LDH-Test)
- Abb. 25:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen der Kontrollsubstanzen auf BT20 (LDH-Test)
- Abb. 26:** Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 (MTT-Test)
- Abb. 27:** Einfluss verschiedener Konzentrationen der Phytoestrogene auf MCF-7 (MTT-Test)
- Abb. 28:** Einfluss verschiedener Konzentrationen der Kontrollsubstanzen auf MCF-7 (MTT-Test)
- Abb. 29:** Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextrakts auf BT20 (MTT-Test)
- Abb. 30:** Einfluss verschiedener Konzentrationen der Phytoestrogene auf BT20 (MTT-Test)
- Abb. 31:** Einfluss verschiedener Konzentrationen der Kontrollsubstanzen auf BT20 (MTT-Test)
- Abb. 32:** Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 (BrdU-Test)
- Abb. 33:** Einfluss verschiedener Konzentrationen der Phytoestrogene auf MCF-7 (BrdU-Test)
- Abb. 34:** Einfluss verschiedener Konzentrationen der Kontrollsubstanzen auf MCF-7 (BrdU-Test)
- Abb. 35:** Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextrakts auf BT20 (BrdU-Test)
- Abb. 36:** Einfluss verschiedener Konzentrationen der Phytoestrogene auf BT20 (BrdU-Test)
- Abb. 37:** Einfluss verschiedener Konzentrationen der Kontrollsubstanzen auf BT20 (BrdU-Test)
- Abb. 38:** Mikroskopischer Nachweis der immunhistochemischen Färbungen der ER α / β - bzw. PR-Expression bei MCF7 und BT20 *in vitro* (32-fache Vergrößerung)
- Abb. 39:** Zusammensetzung des Leinwurzelextrakts (organische Bestandteile) in % der TII
- Abb. 40:** Vergleichsdarstellung der Wirkungen des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 und BT20 im LDH-Test
- Abb. 41:** Vergleichsdarstellung der Wirkungen des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 und BT20 in den BrdU-Tests
- Abb. 42:** Vergleichsdarstellung der Wirkungen von Genistein auf MCF-7 und BT20 in den LDH-Tests
- Abb. 43:** Vergleichsdarstellung der Wirkungen von Genistein und Genistin auf MCF-7 und BT20 in den MTT-Tests
- Abb. 44:** Vergleichsdarstellung der Wirkungen von Genistein und Secoisolariciresinol auf MCF-7 und BT20 in den BrdU-Tests
- Abb. 45:** Vergleichsdarstellung der Wirkungen von Tamoxifen auf MCF-7 und BT20 in den LDH-Tests
- Abb. 46:** Vergleichsdarstellung der Wirkungen von Tamoxifen und 17 β -Estradiol auf MCF-7 und BT20 in den MTT-Tests
- Abb. 47:** Vergleichsdarstellung der Wirkungen von Tamoxifen und 17 β -Estradiol auf MCF-7 und BT20 in den BrdU-Tests
- Abb. 48:** Darstellung des Thermogramms der Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie des untersuchten *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakts

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auswahl der wichtigsten Isoflavone und deren Gehalt in ausgewählten Lebensmitteln in mg/100 g Frischgewicht [*Kulling SE et al., 2003*]

Tab. 2: Auswahl der wichtigsten Lignane in ausgewählten Lebensmitteln in µg/100 g Trockengewicht [*Kulling SE et al., 2003*]

Tab. 3: Auswahl an biologischen Wirkungen von Genistein auf zellulärer Ebene

Tab. 4: Vorgehensweise zur Berechnung der Lebendzellzahl in einer Zellsuspension

Tab. 5: Endkonzentrationen der getesteten Substanzen auf die Zellen

Tab. 6: Durchführung des LDH-Tests

Tab. 7: Durchführung des MTT-Tests

Tab. 8: Durchführung des BrdU-Tests

Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BT20	Mammakarzinom-Zelllinie
cm	Zentimeter
CYP	Cytochrom P450
d	Tag
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamtetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EDL	Enterodiol
ENL	Enterolacton
ER	Estrogenrezeptor
ER α	Estrogenrezeptor alpha
ER β	Estrogenrezeptor beta
EtOH	Ethanol, <i>hier</i> : unvergälltes Ethanol 96 %
EQU	Equol
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRT	hormone replacement therapy (Hormonersatztherapie)
Hsp	Hitzeschockprotein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IGF1R	Insulin like growth factor receptor 1
IgG	Immunglobulin G
INT	2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid
K	Kelvin
kV	Kilovolt
l	Liter
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Lj	Lebensjahr
M	Molar
mbar	Millibar
MCF-7	Mammakarzinom-Zelllinie
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol

mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH + H ⁺	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinucleotid
nm	Nanometer
PBS	Phosphat buffered saline
POD	Peroxidase
PR	Progesteronrezeptor
Py-FIMS	Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
SDG	Secoisolariciresinoldiglycosid
sek	Sekunde(n)
Temp	Temperatur
TGFβ	Transforming growth factor β
TMB	Tetramethylbenzidin
TII	totale Ionenintensität

1. Einleitung

1.1. Mammakarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts erkranken jährlich ungefähr 200.000 Frauen in Deutschland an Krebs (zum Vergleich: Männer ca. 230.000). Darunter bilden die Malignome der weiblichen Brustdrüse mit einer jährlichen Inzidenz von mittlerweile rund 58.000 bei weitem die größte Gruppe an Krebsneuerkrankungen unter Frauen (ca. 29 %) (**Abb. 1**).

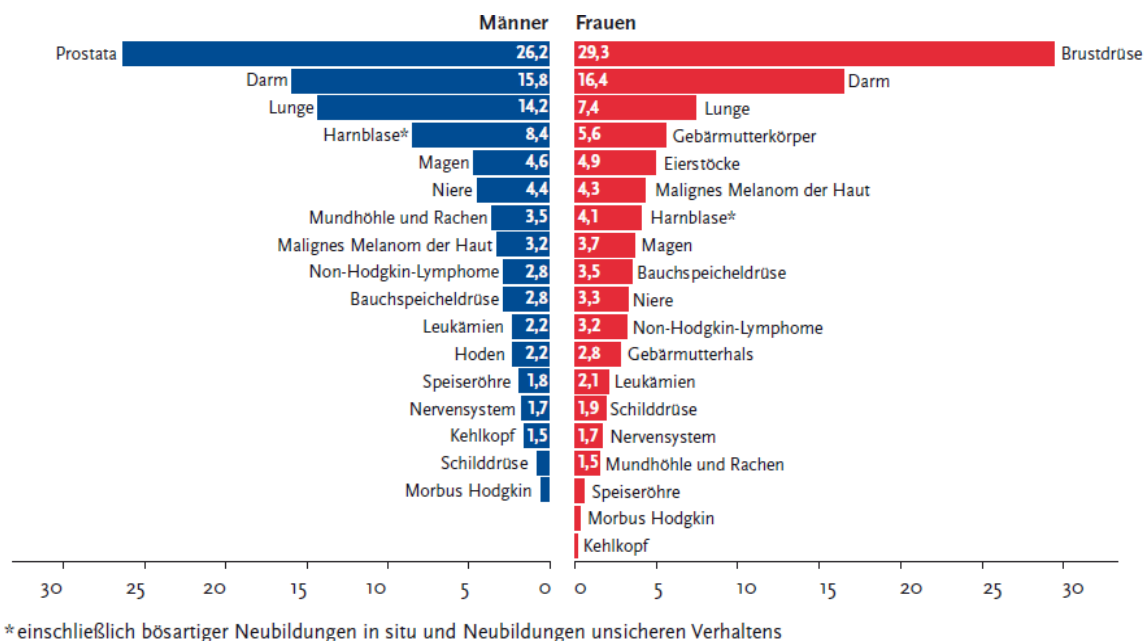


Abb. 1: prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2006 [Robert Koch-Institut, 2010]

Seit den 1980er Jahren ist die Häufigkeit des Mammakarzinoms in Deutschland stetig angestiegen. Die Zahl aufgetretener Neuerkrankungen stieg bis 2004 um mehr als 65 %, ist aber seitdem ungefähr gleichbleibend. Das Mammakarzinom ist nach wie vor mit rund 18.000 Sterbefällen pro Jahr die häufigste Krebstodesursache bei Frauen (ca. 18 %). Erfreulicherweise nimmt seine Mortalität jedoch, trotz der gestiegenen Inzidenzraten, in Deutschland seit Mitte der 1990er Jahre leicht ab bzw. ist nahezu konstant (**Abb. 2**).

Statistisch gesehen erkranken in Deutschland etwa 10 bis 12 von 100 Frauen im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom, wobei die Inzidenz- und Mortalitätsraten, wie bei der Mehrzahl der Malignome, mit dem Alter steigen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei ungefähr 64 Jahren und ist damit niedriger als bei den meisten anderen Krebserkrankun-

gen. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Brustkrebspatientinnen werden derzeit, über alle Stadien betrachtet, mit ca. 85 % angegeben. Es sind zunehmend längere Krankheitsverläufe zu beobachten. Insgesamt betrachtet kann jedoch trotz Einführung neuer adjuvanter und palliativer Behandlungsmethoden sowie der Etablierung neuester Tumorchirurgie und Vorsorgeprogramme keine günstigere Prognose in naher Zukunft erwartet werden. Deswegen rückte in den letzten Jahren die Frage nach präventiven Maßnahmen immer stärker in den Fokus der wissenschaftlichen Forschung.

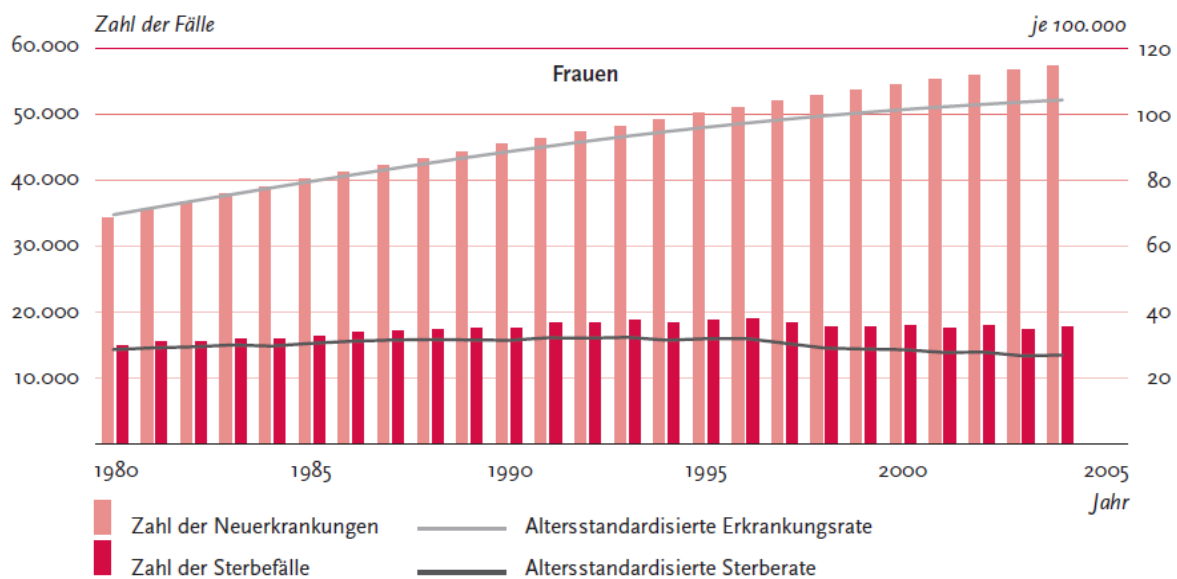


Abb. 2: Jährliche Neuerkrankungs- und Sterbefälle sowie altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten des Mammakarzinoms (Europastandard), Deutschland 1980 – 2004, ICD-10 C50 [Robert Koch-Institut, 2010]

1.1.2. Geographische Unterschiede

Aber nicht nur in Deutschland, sondern auch weltweit betrachtet zählt das Mammakarzinom zu den häufigsten Krebserkrankungen der Frau. Auffällig ist jedoch, dass sich seine Inzidenzen zwischen den verschiedenen Kulturkreisen und Regionen zum Teil stark unterscheiden (**Abb. 3**). So zeigen zahlreiche epidemiologische Statistiken, dass v.a. bei Frauen aus dem asiatischen Raum signifikant niedrigere Inzidenzen und Mortalitäten bezüglich des Mammakarzinoms auftreten, als dies bei europäischen oder nordamerikanischen Frauen der Fall ist. Demnach haben z.B. Frauen aus Hongkong ein nur ungefähr halb so großes Brustkrebsrisiko wie Frauen in den USA [Deapen D et al., 2002]. Andere Autoren beschreiben sogar ein bis zu 7-fach erniedrigtes Brustkrebsrisiko asiatischer Frauen im Vergleich zu jenen in den USA [Ursin G et al., 1994; Ziegler RG et al., 1993]. Ebenso sind Inzidenzen anderer hormonabhängiger Erkrankungen wie Uterus- und Prostatakrebs, Osteoporose, Herz-

Kreislaufkrankungen sowie klimakterischer Beschwerden in Asien sehr viel geringer als in Europa bzw. den USA [Adlercreutz H, 1990; Usui T, 2006].

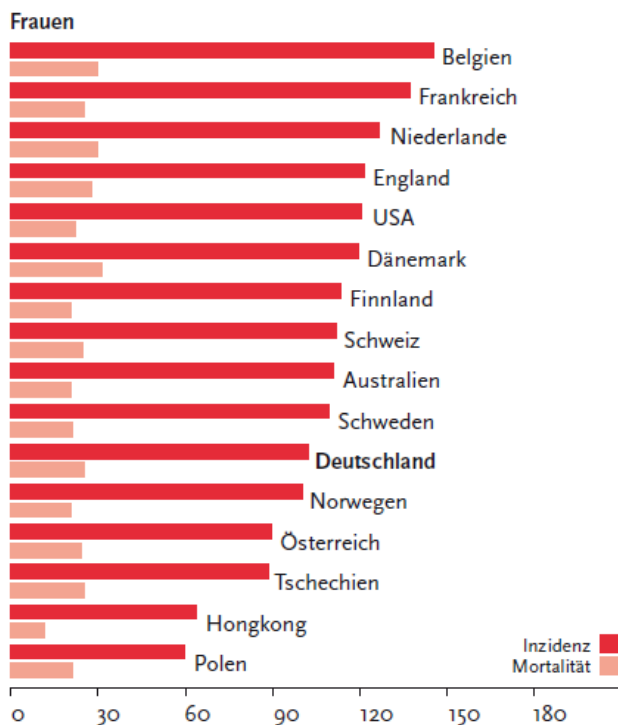


Abb. 3: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten in Deutschland im internationalen Vergleich 2006, ICD-10 C50 (außer Frankreich, Australien: 2005, Schweiz: 2003-2006, Belgien Sterberaten: 2004), *Fälle pro 100.000* [Robert Koch-Institut, 2010]

Wovon genau diese epidemiologischen Unterschiede abhängen, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Anfangs wurden populationsgenetische Ursachen dafür verantwortlich gemacht. Dies konnte jedoch durch eine Vielzahl an Migrationsstudien widerlegt werden. Japanische Frauen wiesen nach Immigration in die USA eine rapide Erhöhung der Brustkrebsinzidenz auf [Deapen D et al., 2002]. Je länger die Immigrantinnen in den USA lebten und ihre traditionellen Lebensgewohnheiten aufgaben, desto höher stieg auch die Inzidenz hormonabhängiger Malignome, u.a. des Mammakarzinoms [Shimizu H et al., 1991]. Weibliche Nachkommen von Asiaten, die in westliche Länder immigrierten, wiesen bereits die gleiche Brustkrebsrate auf wie die Frauen des Gastlandes [Ziegler RG et al., 1993; Probst-Hensch NM et al., 2000; Shimizu H et al., 1991]. Daraufhin wurde die niedrigere Brustkrebsinzidenz in asiatischen Ländern in zahlreichen Studien mit der unterschiedlichen Ernährungsweise assoziiert. Die asiatische Ernährung beinhaltet traditionsgemäß, anders als die der „westlichen“ Länder, eine Vielzahl von Sojaprodukten. Soja wiederum ist reich an Phytoestrogenen, v.a. an Isoflavonen, denen man eine antikanzerogene Wirkung zuschreibt [Adlercreutz H, 1995]. Während die

täglich aufgenommene Menge an Phytoestrogenen in Ost- und Südostasien pro Person auf durchschnittlich 20-50 mg/d beziffert wird, beträgt sie in den USA nur 0,15-3 mg/d und in Europa nur 0,49-1 mg/d [Adlercreutz H, 1998; Sirtori CR et al., 2005].

Obwohl man mittlerweile weiß, dass eine Vielzahl an komplexen Faktoren wie z.B. die Populationsstruktur (Alter, Rasse, Volkszugehörigkeit), verschiedene Umweltfaktoren, die klassischen Risikofaktoren (siehe 1.1.3.), Möglichkeiten der Diagnostik sowie die Qualität der medizinischen Versorgung bei den weltweiten Unterschieden bezüglich Inzidenz, Mortalität und Überleben des Mammakarzinoms eine Rolle spielen, könnten diese Ernährungsfaktoren eine wesentliche Erklärung für die Diskrepanz des Brustkrebsrisikos zwischen den asiatischen und den „westlichen“ Ländern sein [Hortobagyi GN et al., 2005; Adlercreutz H, 2002]. Eine phytoestrogenreiche Ernährung bzw. Nahrungsergänzung könnte schließlich in Zukunft die Basis für eine Chemoprophylaxe hormonabhängiger Malignome, u.a. von Brustkrebs sein. Eventuell lassen sich aus den Phytoestrogenen sogar therapeutische Wirkstoffe gegen verschiedene maligne Tumorerkrankungen ableiten.

1.1.3. Ätiologie und Einteilung

Prädisponierende Faktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms sind Nullipara („hoher sozioökonomischer Status“, „Nonnenkarzinom“), späte Erstparität (> 30. Lj), nicht stillende Frauen, frühe Menarche (< 12. Lj) und späte Menopause (> 52. Lj), Adipositas in der Postmenopause/Senium, Makromastie, Diabetes mellitus, Zigarettenrauchen, erhöhter Alkoholkonsum sowie ein vorangegangenes Mammakarzinom der Gegenseite (5 bis 10-fach erhöhtes Risiko).

Ein großer Risikofaktor ist die genetische Disposition, welche ungefähr 5 % aller Patientinnen mit einem Mammakarzinom betrifft. Am häufigsten sind Mutationen im autosomal-dominant vererbten BRCA-1-Gen (Chromosom 17q21) oder BRCA-2-Gen (Chromosom 13q12-13), seltener auch im TP₅₃-Gen, ATM-Gen oder PTEN-Gen. Bei diesen Genmutationen ergibt sich ein hohes Entartungsrisiko mit einem Lebenszeitrisiko für ein Mammakarzinom von bis zu 80-90 %. Außerdem ist gleichzeitig u.a. das Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms erhöht. Aber auch Veränderungen anderer Gene, u.a. p53, c-myc, c-erbB1, c-erbB2 (Her2/neu), c-Ki-ras und bcl-2, erhöhen das Risiko einer Karzinomentstehung in der Brust.

Weitere Risikofaktoren bzw. Vorstufen sind u.a. die fibrozystische präkanzeröse Mastopathie (Stadium Pechtel III: mind. 10 %iges Entartungsrisiko), das Carcinoma in situ (30 bis 50 % Übergang in ein invasives Karzinom), Strahlung sowie die Hormonsubstitution in den Wechseljahren über einen längeren Zeitraum (> 5 Jahre: relatives Risiko 1,35).

Beim Mammakarzinom unterscheidet man das von den Milchgängen ausgehende duktales Karzinom (ca. 75 %), das vom Epithel der Drüsentubuli ausgehende lobuläre Karzinom (ca. 15 %) sowie Mischtumoren. Das duktales Karzinom kann in weitere morphologische Unterformen wie das tubuläre, papilläre, medulläre, adenoid-zystische, mukoide, Gallert-, Comedo- oder das inflammatorische Karzinom eingeteilt werden.

1.1.4. Pathogenese und Molekularpathologie

Heute wird davon ausgegangen, dass sich ein Mammakarzinom als Folge eines mehrstufigen Prozesses von genetischen Veränderungen („multistep-Karzinogenese“) bildet. Diese Veränderungen beeinflussen das Wachstum, die Teilung und die Entwicklung von Zellen auf der Ebene der Zellkommunikation in vielfältiger Weise. Auf der untersten Stufe steht der Kontakt mit einem krebserregenden Stoff (Karzinogen) oder einer krebserregenden Einflussgröße (z.B. energiereiche Strahlung). Dieser Kontakt verursacht Schäden am menschlichen Erbgut, die z.T. nicht repariert werden können. Nach einer unbestimmten Zeitspanne (Latenzzeit) - wenige Jahre bis Jahrzehnte - kommt es in dem betroffenen Gewebe durch genetische Instabilität zum entarteten, unkontrollierten Wachstum der geschädigten Zellen. Diese so entstandene präkanzeröse atypische Hyperplasie (Carcinoma in situ) kann schließlich, getriggert durch einen weiteren kaskadenartigen Ablauf von genetischen Störungen, zu einer Tumorprogression führen und schließlich durch invasives Wachstum maligne werden. Daran sind u.a. eine vermehrte Expression wachstumsfördernder Onkogene wie Her2/neu, int-2, c-ras und c-myc beteiligt. Man geht davon aus, dass eine Amplifikation von c-erbB2 (Her2/neu) mit einer steigenden Malignität einhergeht und die Beteiligung von c-myc für die rapide Progression verantwortlich ist [Garcia I et al., 1989]. Her2/neu wurde als Onkogen klassifiziert, welches für ein Membranprotein kodiert, das molekulare Ähnlichkeit mit dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) hat. Damit ist es einerseits in die Differenzierung, andererseits in die Proliferationsprozesse von Tumorzellen eingebunden [Coussens L et al., 1985]. Desweiteren kommt es zu einer verminderten Expression bzw. Funktionsbeeinträchtigung wachstumshemmender Tumorsuppressorgene wie BRCA 1/2, p53, PTEN-gen, ATM-Gen, NM23 und RB1 [Lee EY et al., 1988; Varley JM et al., 1989; Hennessy C et al., 1991; Tommasi S et al., 2003]. Weitere Mechanismen der Tumorentstehung sind die Beeinträchtigung der Zellzykluskontrolle (Cyclin-D1) und die Verminderung der Integrin-vermittelten Zelladhäsion (E-Cadherin) [Lung JC et al., 2002]. Aber auch die Expression matrixauflösender Proteasen, die das umliegende Gewebe zerstören und damit die Tumordinvasion erleichtern, sowie eine Erhöhung von Angiogenesefaktoren, die die Gefäßproliferation und somit

eine verbesserte Tumorernehrung fördern, tragen zum Tumorwachstum bei [Riede UN et al., 2004].

1.2. Pflanzenwirkstoffe

1.2.1. Sekundäre Pflanzenwirkstoffe

Grundsätzlich werden primäre und sekundäre Pflanzenwirkstoffe unterschieden. Bei den primären Pflanzenwirkstoffen handelt es sich um Substanzen, die vom menschlichen Körper als Nahrungsstoffe wie Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße verwendet werden können. Die sekundären Pflanzenwirkstoffe dagegen sind für den menschlichen Organismus weder essentiell noch verwertbar. Sie werden u.a. auch als „Vitalstoffe“, „Phytamine“, „Phytochemicals“ oder „Phytoprotectants“ bezeichnet und lassen sich in 14 Klassen einteilen: Sulfide, Phytate, Flavonoide, Glucosinolate, Carotinoide, Cumarin, Monoterpene, Triterpene, Lignane, phenolische Säuren, Indole, Isothiocyanate, Phtalide und Poline [Caragay AB, 1992]. Lange Zeit war die Funktion dieser sekundären Pflanzenstoffe ungeklärt. Anfangs dachte man, dass diese „Nebenprodukte“ des pflanzlichen Organismus dazu dienen, unnütze oder toxische Stoffwechselprodukte des primären Stoffwechsels zu eliminieren. Heute aber weiß man, dass diese wichtige ökologische Aufgaben, v.a. in der Interaktion mit der Umwelt, erfüllen. So dienen sie in der Pflanze z.B. als Wachstumsregulatoren, Farb- und Lockstoffe oder Abwehrstoffe gegen Schädlinge und Krankheiten. Aber auch auf den menschlichen Organismus können sie verschiedene Wirkungen entfalten. Beispielsweise sollen Reserpine aus der australischen Bitterrinde den Bluthochdruck senken [Vakil RJ, 1949], Sulfide aus Knoblauch antithrombotische und krebsprotektive Eigenschaften besitzen [Ariga T et al., 2006], Phytine aus Getreide an der Regulation des Blutzuckers beteiligt sein [Panlasigui LN et al., 2006] sowie Phytosterine/Saponine aus zahlreichen Gemüsepflanzen antiinflammatorisch und antinozizeptiv wirken sowie den Cholesterinspiegel senken [Moharram FA et al., 2007].

1.2.2. Phytopharmaka

Phytopharmaka sind Arzneimittel, deren wirksame Bestandteile ausschließlich pflanzlicher Herkunft sind. Dabei kann ein Phytopharmakon aus einem oder mehreren pflanzlichen Wirkstoffen bestehen, wobei die pflanzlichen Wirkstoffe zumeist selbst Vielstoffgemische verschiedener Pflanzeninhaltsstoffe sind.

Phytopharmaka werden in der Regel durch Extraktion aus frischen oder getrockneten Pflanzen hergestellt. Gängige Verfahren zur Gewinnung der Stoffe sind beispielsweise die Herstel-

lung eines Extrakts durch Mazeration (Extraktion nur bis zum Extraktionsgleichgewicht) oder durch Perkolation (erschöpfende Extraktion). Phytopharmaka können rechtlich gesehen nicht patentiert werden, da sie im Sinne des Patentrechts keine Erfindungen, wie z.B. die synthetischen Wirkstoffe, sind. Liegen für die Anwendung rationale, wissenschaftlich überprüfbare Daten, beispielsweise aus klinischen Studien zugrunde, spricht man von sog. rationalen Phytopharmaka. Die Verwendung traditioneller Phytopharmaka hingegen basiert auf ihrer langjährigen Anwendung. Alternative Phytopharmaka sind Arzneimittel der Alternativmedizin, wie beispielsweise der Bach-Blütentherapie und der Hildegard-von-Bingen-Medizin. Zu den transkulturellen Phytopharmaka zählen beispielsweise Präparate der ayurvedischen Medizin und der traditionellen chinesischen Medizin. Homöopathische und anthroposophische Arzneimittel werden hingegen in der Regel nicht als Phytopharmaka angesehen.

Arzneimittelqualität und -sicherheit werden bei den pflanzlichen Arzneimitteln ebenso hoch angesetzt wie bei chemisch-synthetisierten Medikamenten. Durch diesen wissenschaftlichen Ansatz unterscheiden sich die Phytopharmaka von zahlreichen anderen „alternativen Behandlungsmethoden“.

1.2.3. Der Lein (*Linum usitatissimum*)

Der Gemeine Lein (*Linum usitatissimum*), auch Saat-Lein oder Flachs genannt, gehört zur Pflanzenfamilie der Linaceae (Leingewächse) und ist eine der ältesten Kulturpflanzen. Es gibt mehrere Convarietäten sowie etliche Sorten, in der Praxis wird jedoch - je nach kommerzieller Verwendung - zwischen Faserlein und Öllein unterschieden.

Die ältesten Funde der Leinenverarbeitung sind Leinenstoffe aus Ägypten aus dem Beginn des 4. Jahrtausends v. Chr. Während des Altertums wurde Lein v.a. für die Herstellung von Stoffen und Schiffsegel genutzt. Nach Europa kam der Lein ca. im 2. Jahrtausend v. Chr. und war über Jahrtausende der gebräuchlichste pflanzliche Faserlieferant. Zwischen dem 12. und 13. Jahrhundert n. Chr. war Deutschland führend im Flachsanzbau. Herstellung und Handel von Leinen waren im Mittelalter und in der frühen Neuzeit wichtige wirtschaftliche Säulen für zahlreiche europäische Städte wie Venedig, Mailand oder Antwerpen. Aber auch deutsche Städte wie Ulm, Köln oder Augsburg und Dynastien wie die Welser & Fugger verdankten ihren Reichtum zum Teil der Leinenverarbeitung. Ebenso war der Handel mit Leinen ein wichtiger Handelszweig für die Hanse. Durch das Aufkommen der billigeren und leichter zu verarbeitenden Baumwolle gingen die Anbauflächen in Europa gegen Mitte des 20. Jahrhunderts jedoch sehr stark zurück. Heute ist der Flachsanzbau im Wesentlichen auf Frankreich, Belgien und die Niederlande sowie einige jüngere EU-Mitgliedsländer wie

Tschechien, Lettland und Litauen beschränkt. Die größten Anbauländer für Faserlein außerhalb der EU sind China, Russland, Weißrussland und die Ukraine. Der Öllein wird hauptsächlich in Nordamerika, v.a. Kanada angebaut.

Der Gemeine Lein ist eine einjährige Pflanze (Therophyt), die eine Wuchshöhe von 20 bis 100 cm erreicht. Sie besitzt eine kurze, spindelförmige Pfahlwurzel mit feinen Seitenwurzeln. Die Hauptwurzel wird etwa gleich lang wie der Spross. Die Stängel stehen meist einzeln und aufrecht, im Bereich des Blütenstandes sind sie verzweigt. Die stiellosen Laubblätter stehen wechselständig. Der Fasergehalt des Stängels beträgt ca. 19 bis 25 %. Die Blüten sind groß, fünfzählig und über 2 cm breit. Meist sind sie von hellblauer Farbe, selten weiß, violett oder rosa. Blütenbiologisch ist die Leinpflanze homogam, d.h. die Selbstbestäubung (Autogamie) ist vorherrschend, während die Fremdbefruchtung durch Insekten (Auskreuzungsrate) nur ca. 5 % beträgt. Die Frucht der Leinpflanze besteht aus einer fünffächrigen Kapsel, welche die Samen enthält. Die abgeflacht eiförmigen Samen sind ca. 5 mm lang und bis zu 3 mm breit. Ihr Ölgehalt liegt zwischen 30 % und 44 % und ist abhängig von der Sorte, den Umweltbedingungen und dem Reifegrad. Die Ernte des Ölleins erfolgt nach 110 bis 120 Tagen Vegetationszeit. Die Ernte des Faserleins erfolgt zur Gelbreife, d.h. 7 bis 10 Tage vor Vollreife (**Abb. 4**)



Abb. 4: von links nach rechts: Leinfeld zur Blütezeit (Belgien), Blüte, Samenkapseln

Haupterzeugnisse des Leins sind die Fasern und Samen. Bei der Verarbeitung der Fasern wird zwischen den hochwertigeren Langfasern und den als Nebenprodukt entstehenden Kurzfasern unterschieden. Leinenfasern, für die die Langfaser genutzt wird, haben einen Marktanteil bei Textilien von weniger als 1 %. Rund 40 % des Leinens werden zu Bekleidung, 25 % zu Haushaltswäsche, 20 % zu Heimtextilien und 15 % für technische Zwecke verarbeitet. Kurzfasern können zu Papier verarbeitet werden oder finden in Polstermöbelfüllungen, Verbund-

werkstoffen und Dämmstoffen Verwendung. Bei den Samen werden sowohl die des Ölleins als auch die des Faserleins verwertet. Sie gelangen nur zu einem geringen Teil direkt in Backwaren, Reformkost oder Arzneimittel. Der überwiegende Teil wird zur Ölgewinnung eingesetzt. Dabei kann es zum einen als Speiseöl, aber auch in der Industrie zu Herstellung von Farben, Lacken, Firnissen, Wachstüchern und Schmierseife sowie für die Herstellung von Kosmetika und Pflegemitteln verwendet werden. Außerdem ist Leinöl der wichtigste Grundstoff für die Herstellung des Bodenbelags Linoleum.

Aber auch aus medizinischer Sicht war und ist der Lein von Bedeutung. Vor allem seinem Öl wird eine positive medizinische Wirkung zugeschrieben. Es gehört zu den gesündesten Speiseölen überhaupt, da es große Mengen an Omega-3-Fettsäuren enthält. Hauptinhaltsstoffe des Leinöls sind Triglyceride sowie Linolen-, Linol-, Öl-, Palmitin- und Stearinsäure. Desweiteren ist der Anteil an den für den Menschen essentiellen Aminosäuren hoch. Leinöl ist außerdem reich an Vitamin E und Lecithin [Franke W, 1997]. Bereits Hippokrates (460-375 v. Chr.) nannte den Lein als Mittel gegen Katarrhe, Leibweh und Durchfall, Paracelsus (1493-1541 n. Chr.) erwähnte ihn zur Reizlinderung bei Husten. Als Bestandteil von Heil- und Zugsalben hat Leinöl eine schmerzlindernde und entzündungshemmende Wirkung. Heutzutage werden Leinsamen aufgrund ihres hohen Ballaststoffanteils vorwiegend als mildes Abführmittel eingesetzt. Aber auch bei Magen- oder Darmschleimhautentzündungen und Entzündungen im Mund kann der Lein angewendet werden. Äußerlich wird das als Hausmittel bekannte Leinsamensäckchen bei Zahnschmerzen, Ischias, Rheuma, Gallenkoliken, Blasen- und Nierenleiden sowie Gesichtsneuralgien heiß aufgelegt. 2005 war der Lein in Deutschland die Heilpflanze des Jahres.

Seit einigen Jahren werden auch zunehmend antikanzerogene Eigenschaften des Leins bezüglich verschiedener maligner Tumorerkrankungen, u.a. des Mammakarzinoms diskutiert. Dabei haben sich die Untersuchungen der letzten Jahre hauptsächlich auf die Samen der Leinpflanze beschränkt. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine diätische Zuführung von Leinsamen das Wachstum von heterotransplantierten - sowohl hormonabhängigen als auch hormonunabhängigen - Mammakarzinomen *in vivo* (Mäuse) hemmt [Chen J et al., 2004, 2007; 2009; Saggar JK et al., 2010; Wang L et al., 2005]. Desweiteren führte eine Diät mit Leinsamenprodukten zu einer verminderten Metastasierung [Chen J et al., 2002, 2006; Dabrosin C et al., 2002] und Tumorangiogenese [Bergman Jungeström M et al., 2007; Dabrosin C et al., 2002]. Ebenfalls diskutiert wird eine verminderte Inzidenz von durch chemische Karzinogene induzierten Mammakarzinomen [Chen J et al. 2003; Rickard SE, 1999; Serraino M, 1991, 1992]. Bezüglich der tumorpräventiven Wirkung des Leins besteht jedoch noch Klärungsbe-

darf. Als gesichert gilt aber, dass die Einnahme von Leinsamenprodukten die Differenzierung der Drüsenstruktur der Mamma, v.a. während der Phase der Brustentwicklung, stimuliert [Ward WE et al. 2000; Tan KP, 2004; Tou JC et al., 1999].

1.3. Steroidale Hormone

1.3.1. Definition

Steroidhormone, kurz auch Steroide genannt, bilden anteilmäßig ca. 15 % aller im menschlichen Körper vorkommenden Hormone. Sie werden, je nach Struktur und dem entsprechenden Rezeptor an welchem sie binden, in fünf Gruppen eingeteilt: Glucocorticoide, Mineralcorticoide, Androgene, Estrogene und Gestagene [Kreutzig T, 2000]. Abhängig von dem System im menschlichen Organismus, in welches sie regulierend eingreifen, haben sie Einfluss auf Energiegleichgewicht, Zellstoffwechsel, Verhalten, Immunantwort, Elektrolyt- und Wasserhaushalt sowie Reproduktion. Grundbaustein aller Steroidhormone ist das Cholesterin, aus dem über verschiedene Zwischenstufen die Steroidhormone synthetisiert werden. Die Steuerung dieser Schritte unterliegt dem Hypothalamus-Hypophysen-System.

1.3.2. Estrogene

Estrogene sind aromatisierte C₁₈-Steroide, die im Menschen hauptsächlich in der Form von 17 β -Estradiol vorkommen. Andere natürliche Estrogene sind Estron und Estriol. Die Biosynthese der Estrogene läuft über die der Androgene. So wird aus Testosteron durch das CYP-Enzym Aromatase 17 β -Estradiol gebildet. Aber auch aus Androstendion kann über Östron mit Hilfe der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 17 β -Estradiol synthetisiert werden. Estrogene werden hauptsächlich in den Granulosazellen der Ovarien, den Thekazellen des Graaf-Follikels sowie im Corpus luteum gebildet, zu geringen Mengen auch von den Nebennierenrinden. Während der Gravidität entstehen sie zudem in der Plazenta. Auch Männer produzieren in den Testes kleine Mengen an Estrogenen. Zudem wird ein gewisser Teil des zirkulierenden Testosterons im Fettgewebe, ebenfalls katalysiert durch die Aromatase, in 17 β -Estradiol umgewandelt.

Estrogene sind die wichtigsten weiblichen Sexualhormone, wirken aber auch auf den männlichen Reproduktionstrakt. Vor der Geschlechtsreife sind die Estrogene verantwortlich für die Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane und sekundären Geschlechtsmerkmale. Danach steuern sie den Menstruationszyklus und ggf. die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft. Desweiteren haben sie aber auch eine Reihe anderer Wirkungen, wie z.B. eine Hem-

mung des Knochenabbaus, eine stimulierende Wirkung auf das Immunsystem, eine Sensibilisierung für das Hören, einen Einfluss auf das Speichern von Gedächtnisinhalten von Geräuschen und Sprache sowie Auswirkungen auf die Psyche. Nach der Menopause fällt die Estrogensynthese im weiblichen Körper stark ab, wodurch klimakterische Beschwerden wie Hitzewallungen („hot flushes“), Schlafstörungen, Vulvo-Vaginalatrophie und Stimmungsschwankungen auftreten können.

1.3.3. Der Estrogenrezeptor - molekulare Wirkmechanismen

Der Estrogenrezeptor (ER) gehört zu den nukleären Steroidrezeptoren, die Wachstum, Differenzierung und Homöostase in eukaryotischen Zellen regulieren. Bisher wurden zwei Subtypen des ER, α (ER α) und β (ER β), identifiziert. Sie werden von zwei unterschiedlichen Genen exprimiert und haben - wie alle nukleären Steroidrezeptoren - einen gemeinsamen strukturellen Aufbau und sind ligandenabhängig. Beide ER-Typen bestehen aus fünf funktionellen Domänen (A-F): der N-terminalen A/B-Domäne, der zentralen DNA-Bindungsdomäne DBD (C-Domäne), der Hinge-Domäne (D-Domäne), der Ligandenbindungsdomäne LBD (E-Domäne) und der C-terminalen F-Domäne (**Abb. 5**). Während der ER α aus 595 Aminosäuren besteht, enthält der ER β dagegen nur 530. Jedoch weisen beide Rezeptoren einen hohen Grad an Homologie bezüglich der Aminosäuresequenz auf. In der DNA-bindenden Domäne sind sich beide Rezeptortypen zu ca. 97 % ähnlich. Dagegen beträgt die Homologie der Ligandenbindenden Domäne zwischen beiden Rezeptortypen nur ca. 59 %, wodurch verschiedene Liganden selektiv unterschiedlich hohe Affinitäten zu dem jeweiligen Rezeptortyp aufweisen können. In der N-terminalen A/B-Domäne beträgt die Homologie nur etwa 17,5 %. Die A/B-Domäne ist für Protein-Protein-Interaktionen des Rezeptors und die Aktivierung von Zielgenen der DNA durch die beherbergte AF-1 Domäne verantwortlich. Die durch 17 β -Estradiol vermittelte Genaktivierung kann auch über die Transaktivierungsdomäne AF-2 im C-terminalen Ende stimuliert werden.

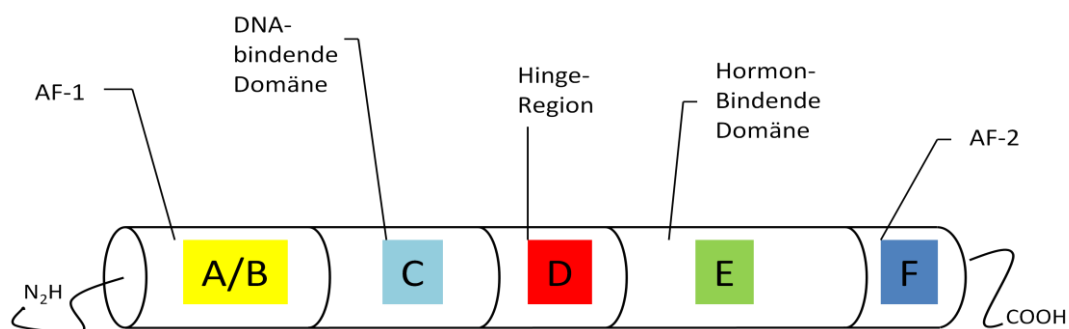


Abb. 5: Schematischer Aufbau des Estrogenrezeptors

Je nach Organsystem sind die beiden ER-Typen unterschiedlich im Körper verteilt. So findet man den ER α überwiegend im Uterus und Brustgewebe, aber auch in der Leber. Er bindet 17 β -Estradiol mit höherer Affinität als der ER β . Dieser ist dagegen vor allem im Knochengewebe, Herz-Kreislaufsystem, in den Eierstöcken, Hoden und Prostata sowie im Gehirn und Gastrointestinaltrakt lokalisiert [Kuiper GG et al., 1998]. Neben den ER sind aber auch Progesteronrezeptoren (PR) auf normalem Brustdrüsenepithel vorhanden.

Im Blut wird das 17 β -Estradiol meist an das „sex-hormone-binding-globulin“ (SHBG) bzw. an Serumalbumin gebunden transportiert und ist dadurch inaktiv. Nur freies 17 β -Estradiol kann über Diffusion durch die Zell- und Kernmembran das nukleäre Zellplasma erreichen. Dort liegt der ER, in Abwesenheit von Liganden, zusammen mit Hitzeschockproteinen (u.a. Hsp90), sog. Chaperonen, in einem Komplex vor. Erreicht das 17 β -Estradiol das Kernplasma, bindet es an den ER, wodurch dieser eine Konformationsänderung verbunden mit der Freisetzung der Hsp durchläuft. Zwei ligandengebundene Rezeptormoleküle bilden ein Dimer aus, welches daraufhin über ein estrogen-response-element (ERE) in der Promotorregion Estrogen-sensitiver Gene an die DNA bindet. Mit Hilfe verschiedener Co-Transkriptionsfaktoren bildet sich schließlich ein Komplex, der zu einer transkriptionellen Aktivierung des Zielgens durch die RNA-Polymerase II führt (Abb. 6).

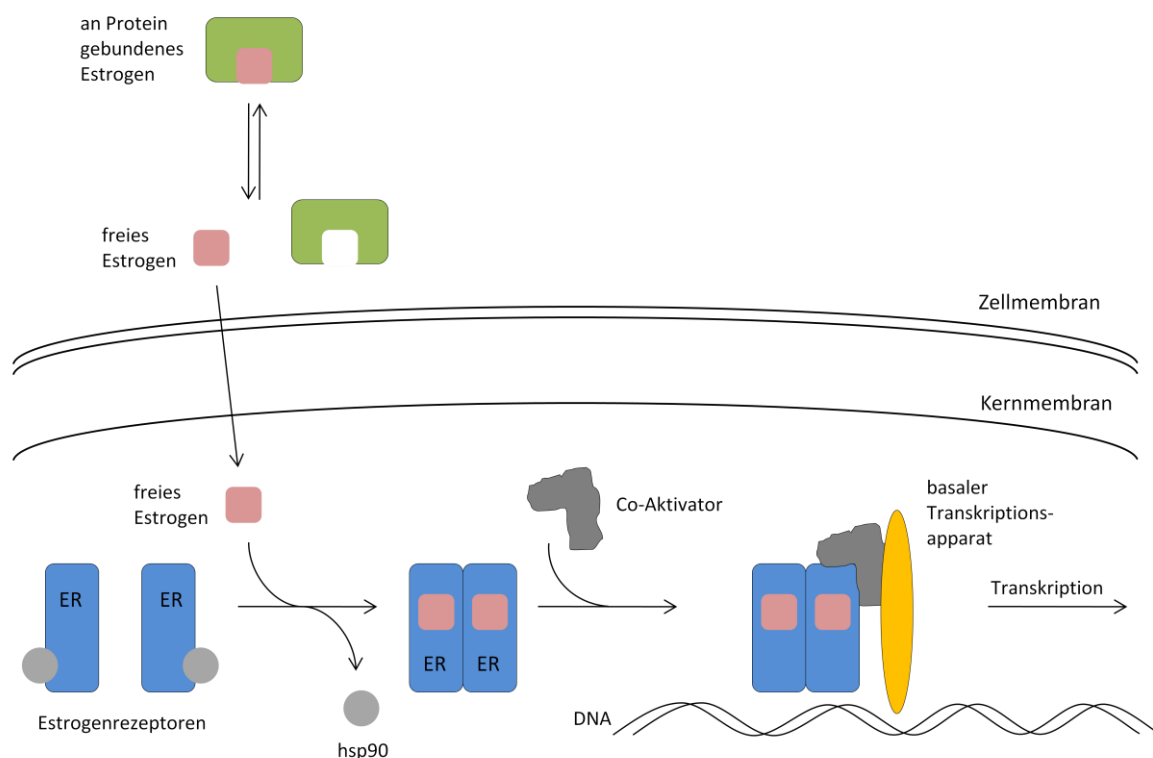


Abb. 6: Schematische Darstellung der ER-vermittelten Signaltransduktion

Neben diesem „klassischen“ Signalweg wurden in letzter Zeit jedoch auch andere, schnellere nicht-genomische Estrogen-Wirkungen beobachtet [Levin ER, 2002; Manavathi B et al., 2006]. Es konnte gezeigt werden, dass es membranständige ER (mER) gibt, welche sowohl an zytosolische als auch membranständige Signalproteine gekoppelt sein können und deren Aktivierung eine Reihe von unterschiedlichen Wirkungen zur Folge haben. So können intrazelluläre Signalkaskaden, wie beispielsweise der MAP-Kinase-Weg aktiviert werden, was wachstumsregulierende Wirkungen zur Folge hat [Nadal A et al., 2001]. Weitere durch 17 β -Estradiol verursachte Effekte sind u.a. eine Steigerung des zellulären Ca²⁺-Influxes und die Bildung von cAMP und IP₃ als Second-Messenger [Levin ER, 2002].

1.3.4. Selektive Estrogen Rezeptor Modulatoren (SERMs)

SERMs sind synthetische, nicht-steroidale Arzneistoffe, die an die ER binden und über diese sowohl Estrogen-agonistische als auch -antagonistische Effekte ausüben können. Ihre Besonderheit ist die gewebsspezifische Wirkung, die sich durch Unterschiede in der Verteilung und Wirkung der beiden ER-Subtypen, der intrazellulären Umgebung im jeweiligen Gewebe sowie der Struktur des SERM-ER-Komplexes und dessen spezifischen DNA-Bindungsstellen erklären lässt. Desweiteren sind noch eine Reihe an mehr oder weniger spezifischen Co-Regulatoren maßgeblich an der Rezeptormodulation und Aktivierung der entsprechenden Transkription beteiligt [Smith CL et al., 2004].

Der bekannteste Vertreter ist das Tamoxifen, welches schon seit mehr als 30 Jahren zur Therapie des ER-positiven Mammakarzinoms verwendet wird (**Abb. 7**). Als nicht-steroidales Anti-Estrogen bindet es an den ER und antagonisiert somit die Wirkung des endogenen Estrogens. Als Folge kommt es zu einer verminderten Signaltransduktion und damit zur Unterbindung der Transkription, was wiederum ein Sistieren des Estrogen-abhängigen Tumorstwachstums zur Folge hat. Auf molekularer Ebene bewirkt Tamoxifen eine Inaktivierung der AF-2 Domäne des ER. Die AF-1 Domäne bleibt aktiv und rekrutiert Co-Aktivatoren. Damit bewirkt Tamoxifen keine vollständige Unterbrechung der Transkription, sondern verlangsamt diese. Ausserdem besitzt Tamoxifen keine rein antagonistischen Wirkungen, sondern vielmehr partiell antagonistische, d.h. es kann gewebsspezifisch auch ER-agonistische Wirkungen verursachen. Dies führt u.a. zu einem positiven Einfluss auf die Knochendichte und zu einer Verminderung der zirkulierenden Cholesterol-Konzentration. Leider geht eine längere Anwendungsdauer mit Resistenzen sowie einem erhöhten Risiko für thromboembolische Komplikationen und der Entstehung von Endometriumkarzinomen einher [Swaby RF et al., 2007].

und war damals ein wertvolles Gut. Ende des 1. Jahrhunderts n. Chr. starb es jedoch hauptsächlich aufgrund seiner Überernte aus. Die Wiederentdeckung der Phytoestrogene ereignete sich schließlich in den 1950er Jahren, als Schafzüchter in Westaustralien unerklärliche Unfruchtbarkeit bei ihren Schafherden feststellten [Bennetts HW *et al.*, 1946]. Als Ursache dafür fanden Forscher einige Jahre später zwei Substanzen im Roten Klee, Genistein und Formononetin. Diese Stoffe verursachten bei den Schafen eine Scheinschwangerschaft, weshalb im darauffolgenden Jahr weniger Schafe Nachwuchs bekamen.

1.4.2. Überblick

Phytoestrogene gehören zu den sekundären Pflanzenwirkstoffen (siehe 1.2.1.) und lassen sich grob in drei Strukturklassen unterteilen: Isoflavone, Lignane und Coumestane. Diese sind in zahlreichen verschiedenen Pflanzen zu finden, oft jedoch nur in relativ geringen Mengen. Viele von diesen Pflanzen sind für den Menschen ungenießbar. Sie dienen in der Pflanze u.a. als Blütenfarbstoffe, Signalstoffe, Lichtschutzsubstanzen, Gerb- und Bitterstoffe, Mikrobizide sowie Antioxidantien [Bitsch R, 1999]. Die Variabilität der Phytoestrogen-Konzentrationen in Pflanzen ist abhängig von der Pflanzenspezies, der Art, der geographischen Lage und dem Klima [Wang HJ *et al.*, 1994]. Biochemisch gesehen lassen sich die Phytoestrogene den Polyphenolen zuordnen. In ihrer Wirkung und Struktur sind sie dem humanen Sexualhormon 17 β -Estradiol ähnlich, was zu ihrer Namensgebung geführt hat [Setchell KD *et al.*, 1999] (Abb. 8).

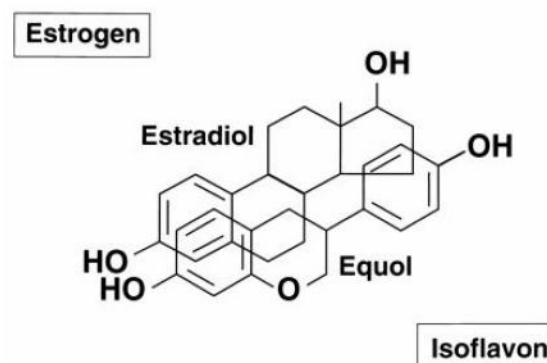


Abb. 8: Strukturelle Ähnlichkeit von Estrogenen und Phytoestrogenen (hier: das Isoflavon Equol) [Setchell KD *et al.*, 1999]

Coumestane sind in der Ernährung des Menschen von untergeordneter Bedeutung, da sie sehr selten und meist nur in minimalen Konzentrationen vorkommen. Deswegen hat sich das Interesse der Forschung bezüglich des antikanzerogenen Potentials v.a. auf die Isoflavone und Lignane fokussiert [Sirtori CR, 2005 *et al.*; Adlercreutz H, 1995].

1.4.3. Isoflavone und Lignane

Isoflavone

Die Isoflavone (Isoflavonoide) sind meist gelblich gefärbte Pflanzenfarbstoffe und gehören zu der Klasse der Flavonoide. Sie kommen überwiegend in Hülsenfrüchtlern (Fabaceae oder Leguminosae) vor. Die bekanntesten und häufigsten Vertreter sind Genistein und Daidzein, welche v.a. in der Sojapflanze vorkommen. Weitere sind z.B. Glycitein aus Soja, Biochanin A und Formononetin v.a. aus Rotklee, Pratensein aus Rot- oder Wiesenklee, Prunetin aus der Rinde von Pflaumenbäumen sowie Quercetin u.a. aus Kapern, Äpfeln und Zwiebeln (**Tab. 1**).

Lebensmittel	Genistein	Daidzein	Glycitein	Biochanin A	Formononetin
Sojabohnen	30–92	20–52	10–14	0,01	0,07
Sojamilch	3–17	1–13	0–2	n. n.	n. n.
Tofu	8–20	7–11	0–5	n. n.	n. n.
Sojasprossen	2,0	2,5	n. b.	n. n.	0–0,2
Kleesprossen	0,1–0,4	0–0,1	n. b.	0,4–0,8	2,3–4,0
Bohnen ^a	0–0,7	0–0,02	n. n.	0–1,4	0–0,2
Erbsen ^a	0–0,6	0–7,3	n. n.	n. n.	n. n.
Obst, Gemüse	0–0,2	0–0,2	n. n.	n. n.	n. n.

^aVerschiedene Sorten; n. n. = unter der Nachweisgrenze; n.b. = nicht bestimmt

Tab. 1: Auswahl der wichtigsten Isoflavone und deren Gehalt in ausgewählten Lebensmitteln in mg/100 g Frischgewicht [Kulling SE et al., 2003]

Ausgang der Biosynthese der Flavonoide ist die Bildung eines Flavanons, welches aus drei Molekülen aktivierter Malonsäure und einer hydroxylierten Zimtsäure entsteht. Aus diesem C₆C₃C₆-Grundkörper werden die Flavonoide und schließlich die Isoflavone (Isoflavonoide) biosynthetisiert. Dabei handelt es sich um Phenylpropane, die sich strukturell hauptsächlich durch verschiedene Kombinationen von Hydroxyl- und Methylgruppen, v.a. am Ring A, unterscheiden (**Abb. 9**).



Abb. 9: Isoflavon-Aglykone der wichtigsten Isoflavone [Kulling SE et al., 2003]

Lignane

Die Lignane sind weit verbreitete, meist farblose, kristalline und geruchlose Verbindungen, die eine große strukturelle Vielfalt besitzen. Man findet sie in allen Getreidesorten und v. a. in ölhaltigen Früchten bzw. Samen von Lein, Sonnenblume, Sesam, Erdnuss und Olive. Aber auch in Kirschen, Äpfeln, Birnen, Pfirsichen, Pflaumen, Beerenfrüchten sowie Kürbis, Karotten, Broccoli, Fenchel, Zwiebeln und Knoblauch wurden Lignane in geringen Mengen nachgewiesen. Die bekanntesten Vertreter sind Secoisolariciresinol und Matairesinol, deren Hauptlieferant die Samen der Leinpflanze sind [Liggins J et al., 2000] (**Tab. 2**). Weitere Lignane sind Pinoresinol, Lariciresinol und Syringaresinol.

Lebensmittel	Secoisolariciresinol	Matairesinol
Leinsamen	370 000	1100
Kürbiskerne	21 400	n. b.
Roggen	47–720	65
Weizen	8–280	n. n.
Reis	16–60	n. n.
Nüsse ^a	96–257	0–6
Bohnen ^a	64–3 050	n. n. bis Spuren
Spargel	6 510	n. b.
Zwiebeln	83	8
Broccoli	414	23
Karotten	192	3
Kartoffeln	10	6
Weißwein, µg/L	135–174	17–22
Rotwein, µg/L	686–1 280	74–98

^averschiedene Sorten; n. n. = unter der Nachweisgrenze; n. b. = nicht bestimmt

Tab. 2: Auswahl der wichtigsten Lignane in ausgewählten Lebensmitteln in µg/100 g Trockengewicht [Kulling SE et al., 2003]

Lignane sind wie die Isoflavone ebenfalls Phenylpropane und entstehen durch Verknüpfung zweier Phenylpropan-Einheiten über das jeweilige C₈-Atom der Arylseitenkette. Lignane sind Zwischenschritte in der Biosynthese der Lignine. Unterschiedliche Strukturvarianten ergeben sich durch zusätzliche Brücken über Sauerstoffatome oder Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen sowie durch Anordnung und Verknüpfung der Seitenketten (**Abb. 10**).

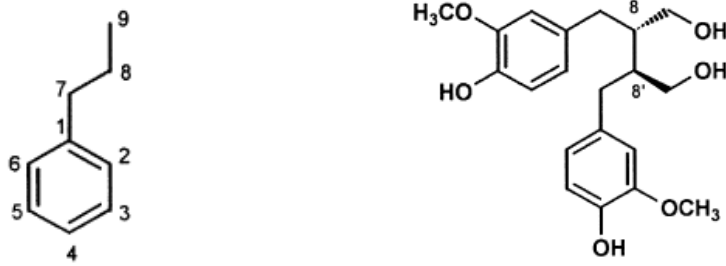


Abb. 10: Phenylpropan als Strukturelement (links); (+)-Secoisolariciresinol (rechts)

1.4.4. Metabolismus

In der Pflanze liegen die Isoflavone größtenteils als Glykoside vor, d.h. es sind Zuckermoleküle, meist D-Glucose oder D-Rhamnose, angelagert. Demgegenüber überwiegen in fermentierten Pflanzenprodukten, wie z.B. Tempeh oder Miso, die aglykosidischen Formen [Coward L et al., 1998]. Aufgenommene Aglykone können aufgrund ihrer Lipophilie und des geringen Molekulargewichtes rasch durch passive Diffusion im Dün- und Dickdarm resorbiert werden [Piskula MK et al., 1999; Setchell KD et al., 2002]. Zugeführte Glykoside dagegen werden größtenteils durch enzymatische Hydrolyse, d.h. Abspaltung der Zuckerreste, in ihre jeweiligen aglykosidischen Formen umgewandelt und erst dann, wie oben beschrieben, resorbiert [Piskula MK et al., 1999; Day AJ et al., 1998]. Diese Hydrolyse geschieht sowohl durch körpereigene (auf und in den Dünndarmzellen lokalisierte) als auch durch körperfremde Glykosidasen der bakteriellen Darmflora [Wilkinson AP et al., 2003; Hur HG et al., 2000 und 2002]. Die Hauptisoflavone sind Genistein bzw. Daidzein, welche nicht nur direkt mit der Nahrung aufgenommen, sondern auch aus anderen Isoflavonen wie Biochanin A bzw. Formononetin gebildet werden [Setchell KD et al., 1988]. Isoflavone, die nicht wie oben beschrieben resorbiert werden, gelangen in den Dickdarm, wo sie einem reduktiven Metabolismus durch intestinale Bakterien unterliegen. Dabei wird Daidzein zunächst zu Dihydrodaidzein und anschließend entweder zu O-Demethylangolensin oder Equol (EQU) umgewandelt [Muthyala RS et al., 2004]. Die Bildung von EQU ist stark von der Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora abhängig, sodass nur ca. 30 % der Bevölkerung der westlichen Länder fähig ist, EQU zu produzieren [Setchell KD et al., 2002; Rowland IR et al., 2000]. Analog zu Daidzein wird Genistein im ersten Schritt zu Dihydrogenistein, anschließend weiter zu 6'-Hydroxy-O-Demethylangolensin und schließlich zu p-Ethylphenol abgebaut [Chang YC et al., 1995; Heinonen S et al., 1999].

Die Lignane sind meist in Form von Diglykosiden, ähnlich wie die Isoflavone meist verknüpft mit D-Glucose oder D-Rhamnose, in den Pflanzen enthalten. Der bekannteste Vertreter ist das

Secoisolariciresinoldiglycosid (SDG). Nach oraler Aufnahme findet auch hier eine enzymatische Hydrolyse durch Glykosidasen statt [Bowey E *et al.*, 2003]. Die entstandenen Aglykone werden jedoch kaum resorbiert, sondern gelangen größtenteils in den Dickdarm, wo durch den Einfluss intestinaler Bakterien eine nahezu vollständige Dehydroxylierung und Demethylierung der pflanzlichen Vorstufen, v.a. Secoisolariciresinol und Matairesinol, zu den sog. Säugerlignan Enterodiol (END) und Enterolacton (ENL) erfolgt [Setchell KD *et al.*, 1988; Niemeyer HB *et al.*, 2003] (**Abb. 11**). Zusätzlich kann auch END zu ENL umgewandelt werden [Kurzer MS *et al.*, 1997]. In diversen Studien wurden nach Ingestion von SDG nur vernachlässigbar geringe Konzentrationen der pflanzlichen Ausgangsverbindungen im Blut und Urin nachgewiesen, stattdessen fanden sich hauptsächlich die Säugerlignane und deren Konjugate im Plasma, weshalb davon auszugehen ist, dass Lignane hauptsächlich in dieser Form im Dickdarm resorbiert werden [Kuijsten A *et al.*, 2005; Niemeyer HB *et al.*, 2003]. Das Verhältnis der beiden Säugerlignane ist interindividuellen Schwankungen unterworfen, sodass der Gehalt an ENL im Plasma und Urin meist höher ist als der von END [Nesbitt PD *et al.*, 1999; Kuijsten A *et al.*, 2005].

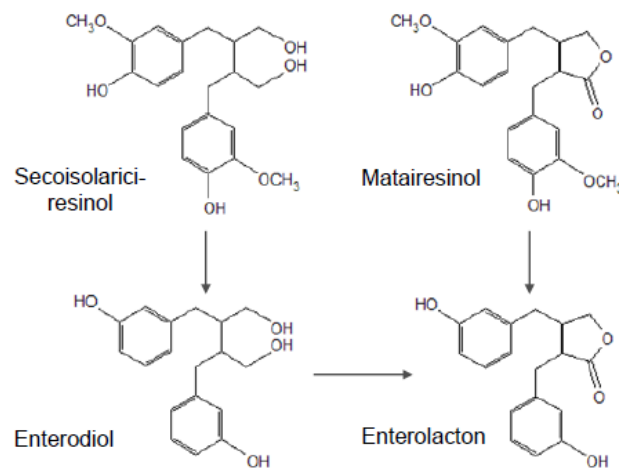


Abb. 11: Umwandlung von Lignanen in „Säugerlignane“

Nach ihrer Resorption gelangen die Isoflavone und Lignane sowie ihre Metabolite schließlich via Pfortader in die Leber. Dort, aber auch schon zu einem Teil in den Enterozyten der Darmwand, unterliegen sie Konjugationsreaktionen, in denen sie überwiegend zu Glucuroniden bzw. Sulfaten umgesetzt werden [Adlercreutz H *et al.*, 1993 und 1995; Sfakianos J *et al.*, 1997; Jansen GH *et al.*, 2005]. Diese Konjugate treten schließlich in die systemische Zirkulation ein und sind somit in zahlreichen Körperflüssigkeiten, wie z.B. Plasma, Urin, Fäzes, Speichel, Muttermilch, Brustdrüsen- und Prostatasekret nachweisbar [Lampe

JW et al., 2003; Hoikkala AA et al., 2003]. Daneben sind Isoflavone und Lignane aber auch Substrate für CYP-abhängige Oxygenasen v.a. der Leber, wodurch sie zu verschiedenen hydroxylierten Verbindungen oxidiert werden [*Kulling SE et al., 2001; Niemeyer HB et al., 2000*].

In zahlreichen Humanstudien wurde die Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik von Isoflavonen und Lignanen nach einmaliger oraler Aufnahme diverser Präparate untersucht. Dabei wurden die Isoflavone schnell resorbiert und zeigten einen Anstieg der Plasmakonzentrationen bereits nach 15 min mit maximalen Konzentrationen nach 4-9 h [*Rowland I et al., 1999; Setchell KD et al., 2001; Watanabe S et al., 1998*]. Der Anstieg verlief dosisabhängig und nicht-linear, wobei Daidzein insgesamt niedrigere Plasmaspiegel zeigte als Genistein. Nach Erreichen einer Maximalkonzentration fielen die Plasmaspiegel nach einer Kinetik 1. Ordnung ab und waren spätestens 48 h nach Isoflavon-Aufnahme wieder auf den Ausgangswert abgesunken. Die Halbwertszeiten von Genistein lagen zwischen 6-11 h, die von Daidzein zwischen 5-9 h [*Setchell KD et al., 2001 und 2003; King RA et al., 1998*]. Dabei bildeten die Isoflavon-Glykoside, abhängig von der jeweiligen Studie, mit einem Anteil von ungefähr 30-60 % den Hauptbestandteil im Plasma, während die Isoflavon-Aglykone nur zwischen 10-20 % ausmachten [*Shelnutt SR et al., 2002; Adlercreutz H et al., 1995; Zhang Y et al., 2003*]. Aber auch in verschiedenen Geweben wurden Isoflavone detektiert, wobei zu beachten ist, dass die im Plasma gemessenen Konzentrationen nicht zwangsläufig auf die im Gewebe übertragbar sind. Anders nämlich als im Plasma erschienen in peripherem Brustgewebe von Ratten hauptsächlich Aglykone, wobei deren Konzentration im Vergleich zum entsprechenden Plasma sogar höher war. Es wird angenommen, dass die Aglykone aufgrund ihrer Lipophilie im Gewebe akkumulieren [*Chang HC et al., 2000*].

Im Gegensatz zu den Isoflavonen erschienen die Säugerlignane nach einmaliger Einnahme pflanzlicher Lignane erst 8-10 h später im Plasma, was vermutlich auf deren oben beschriebene Umwandlung zurückzuführen ist [*Lampe JW et al., 2006; Kuijsten A et al., 2005*]. Nach ca. 15-24 h waren die maximalen Plasmaspiegel von END bzw. ENL erreicht, ihre Halbwertszeiten lagen bei ca. 4 bzw. 13 h, nach ca. 21 bzw. 36 h waren sie wieder aus dem Plasma verschwunden [*Kuijsten A et al., 2005*]. Die relativ hohen Halbwertszeiten sowie die lange Präsenz im Körper führen dazu, dass die Säugerlignane im Plasma akkumulieren und so steady-state Konzentrationen erreichen können, wenn sie 2-3 mal am Tag konsumiert werden [*Kuijsten A et al., 2005; Penalvo JL et al., 2004*]. Die Säugerlignane finden sich im Plasma größtenteils als ENL-sulfat, ENL-glucuronid und END-glucuronid wieder und liegen somit ähnlich wie die Isoflavone hauptsächlich als Glucuronide vor.

Der größte Anteil der Isoflavone und Lignane sowie ihrer Metabolite wird auf renalem Weg ausgeschieden. Ein Teil der Ausscheidung kann auch biliär erfolgen. Gelangen die Konjugate mit der Galle in den Darm, können sie durch Enzyme der Darmflora erneut gespalten und resorbiert werden. Damit unterliegen Phytoestrogene, ähnlich den körpereigenen Steroidhormonen, einem enterohepatischen Kreislauf, was letztendlich zu einer verlängerten Exposition mit diesen Phytochemicals führt [Setchell KD *et al.*, 1999; Murkies AL *et al.*, 1998]. Die Ausscheidung mit den Fäzes liegt meist unter 5 % [Watanabe S *et al.*, 1998].

Grundsätzlich unterliegt der Metabolismus der Phytoestrogene großen interindividuellen Unterschieden, was v.a. auf die Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora, aber auch auf Ernährung, Geschlecht und Alter zurückzuführen ist [Lampe JW, 2003]. Es ist deswegen sehr schwierig, allgemeingültige Aussagen über sie zu treffen.

1.4.5. Biologische Wirkungen

Für die Phytoestrogene wird seit Jahren eine Vielzahl an unterschiedlichen Wirkungen auf zellulärer Ebene beschrieben. Wie auch die SERMs (siehe 1.3.4.) können sie an den ER binden, wobei sie meist eine höhere Affinität zum ER β als zum ER α zu haben scheinen [Kuiper GG *et al.*, 1998]. Insgesamt ist die Affinität zum ER, verglichen zu 17 β -Estradiol, jedoch niedriger [McCarty MF, 2006; van der Woude H *et al.*, 2005]. Aber auch zwischen den einzelnen Phytoestrogenen und in Abhängigkeit von ihrer Konzentration bestehen Unterschiede in ihrer Affinität und Wirkung. Die höhere Bindungsaffinität zum ER β könnte den vermuteten antikanzerogenen Effekt gegenüber dem Mammakarzinom erklären, da der ER β das Wachstum von Mammazellen inhibiert, während dieses über ER α stimuliert wird [An J *et al.*, 2001]. Einige Studien postulieren desweiteren einen inhibitorischen Effekt des ER β auf den ER α [Hall JM *et al.*, 1999]. Jedoch ist nicht vollständig geklärt, inwiefern Phytoestrogene das 17 β -Estradiol ersetzen, mit ihm um die Bindungsstellen am ER konkurrieren oder auch unabhängig an sekundären Bindungsstellen des ER angreifen [Oseni T *et al.*, 2008]. Wie auch bei den SERMs sind sicherlich auch Co-Regulatoren an den Wirkungen der Phytoestrogene beteiligt. Aufgrund ihrer Eigenschaft, sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkungen am ER zu verursachen, werden Phytoestrogene auch als „natural SERMs“ oder „phyto SERMs“ bezeichnet.

Die Wirkmechanismen der Phytoestrogene sind aber bei weitem nicht auf die ER beschränkt, sondern erstrecken sich vielmehr auf eine Reihe anderer Signalwege, wie z.B. die Interaktion mit verschiedensten Enzymsystemen. **Tab. 3** gibt einen Überblick über verschiedene zelluläre

Wirkungen des Isoflavons Genistein, welches das bis dato wohl am besten untersuchte Phytoestrogen ist.

Zelluläre Aktivität	In vitro	Tiermodell	Hemmung	Stimulation	Autoren
Aromataseaktivität	+		+		<i>Adlercreutz H et al., 1993; Pelissero C et al., 1996</i>
17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1	+		+		<i>Strauss L et al., 1998; Deluca D et al., 2005</i>
Tyrosin-Protein-Kinase	+		+		<i>Akiyama T et al., 1987, Polkowski K et al., 2000</i>
5 α -Reduktase	+		+		<i>Evans BA et al., 1995</i>
Prostaglandin-synthase	+		+		<i>Degen GH, 1990</i>
Lipid peroxidation	+		+		<i>Arora A et al., 1998</i>
DNA-Topoisomerase II	+		+		<i>Polkowski K et al., 2000</i>
Angiogenese	+		+		<i>Fotsis T et al., 1993</i>
Gonadotropine		+	+		<i>Trisomboon H et al., 2005</i>
Nitric oxide synthase (NOS)		+	+		<i>Duarte J et al., 1997</i>
Cyclin D1-Aktivität	+		+		<i>Waite KA et al., 2005</i>
Estrogenagonist	+		+	+	<i>Zava DT et al., 1997</i>
Sex hormone binding globulin (SHBG)	+			+	<i>Mousavi Y et al., 1993</i>
Antioxiative Aktivität	+			+	<i>Polkowski K et al., 2000</i>
Osteoprotegerin-Synthese	+			+	<i>Viereck V et al., 2002</i>
TGF β	+			+	<i>Kim H et al., 1998</i>
Intrazelluläres Ca ²⁺	+			+	<i>Dopp E et al., 1999</i>
Complement C ₃ -Genexpression	+			+	<i>Dopp E et al., 1999</i>

Tab. 3: Auswahl an biologischen Wirkungen von Genistein auf zellulärer Ebene

Viele dieser Wirkungen wären mit einer antikanzerogenen Aktivität sowie einer Prävention bezüglich der Mammakarzinomentstehung in Einklang zu bringen [*Oseni T et al., 2008*]. Andererseits werden aber auch genotoxische Wirkungen der Phytoestrogene, v.a. der Isoflavone, wie z.B. die Induktion von Mikrokernen und struktureller Chromosomenaberrationen, diskutiert [*Di Virgilio AL et al., 2004; Kulling SE et al., 1999*]. Trotz einer großen Anzahl an Studien besteht noch immer vielfach Unklarheit über die Wirkmechanismen der Phytoestrogene und die Frage, inwieweit diese therapeutisches und chemopräventives Potential bezüglich des Mammakarzinoms besitzen [*Mense SM et al., 2008*].

1.4.6. Klinische Wirkungen

Im Zusammenhang mit den klinischen Wirkungen der Phytoestrogene werden immer wieder v.a. die Linderung klimakterischer Beschwerden, die Prävention von Osteoporose sowie ein günstiger Einfluss auf den Lipidhaushalt und somit eine kardioprotektive Wirkung genannt. Bezüglich der klimakterischen Beschwerden und Osteoporose wird vermutet, dass Phytoestrogene das postmenopausal verminderte 17β -Estradiol, aufgrund ihrer estrogenen Aktivität, teilweise ersetzen und so den, durch den natürlichen Abfall des endogenen Estrogens verursachten, Beschwerden entgegenwirken. Deswegen werden Phytoestrogenpräparate als Alternative zur klassischen HRT diskutiert und sind mittlerweile zahlreich, meist auf der Basis von Soja- oder Rotklee, in Apotheken und Reformhäusern zu finden. Nach zahlreichen Studien an Tier und Mensch sind die therapeutischen Wirkungen bezüglich dieser sehr komplexen Fragestellungen jedoch noch immer fraglich [de Cremoux P et al., 2010; Poulsen RC et al., 2008]. Was die Wirkungen auf den Lipidhaushalt betrifft, scheinen Sojaprodukte in Human- und Tierstudien LDL-Cholesterin zu verringern. Die Effekte auf Triglyceride oder HDL-Cholesterin sind bisher aber noch undeutlich [Cassidy A et al., 2006]. Es gilt jedoch als noch nicht erwiesen, dass diese Effekte durch Phytoestrogene hervorgerufen werden.

Die wohl komplexeste Fragestellung ist die der Rolle der Phytoestrogene im Zusammenhang mit malignen, v.a. hormonabhängigen Tumorerkrankungen wie Brust-, Ovarial- und Prostatakrebs, wobei im Folgenden nur auf das Mammakarzinom eingegangen wird.

Hierbei wird zum einen eine chemopräventive Wirkung der Phytoestrogene diskutiert. In Studien an Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Genistein das Auftreten von Mammakarzinomen, welche durch chemische Kanzerogene induziert wurden, verringerte [Lamartiniere CA et al., 2000]. Dabei gibt es Anzeichen, dass eine Genistein-haltige Diät nur in bestimmten Entwicklungsphasen des Lebens, nämlich vor und während der Pubertät, einen protektiven Effekt hat [Lamartiniere CA, 2000; Warri A et al., 2008]. Trotz vieler positiver Ergebnisse gibt es nach zahlreichen epidemiologischen und experimentellen Untersuchungen insgesamt gesehen keine klaren Beweise, dass die Einnahme von Phytoestrogenen das Risiko der Entwicklung eines Mammakarzinoms günstig beeinflusst, sodass Empfehlungen hinsichtlich einer solchen Ernährung im Moment nicht gegeben werden können [Messina M et al., 2006; Trock BJ et al., 2006; Gikas PD et al., 2005].

Zum anderen werden therapeutische Effekte bei schon bestehenden Mammakarzinomen diskutiert. Sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien, meist an Mäusen, haben gezeigt, dass verschiedene Phytoestrogene, v.a. Genistein, in hohen Konzentrationen hemmend auf das

Wachstum von Mammakarzinomen wirken sowie z.T. Apoptose induzieren können [*de Lemos ML, 2001; Xu J et al., 2001*]. Viele dieser Wirkungen wurden hauptsächlich *in vitro* beobachtet. Es ist jedoch sehr fraglich, ob diese hohen antikanzerogenen Konzentrationen auch *in vivo* erreichbar sind. Wahrscheinlich beruhen die *in vivo* erreichten antikanzerogenen Effekte auf der Summe verschiedener Partialwirkungen, die auf allen Stufen der Karzinogenese wirken - antioxidativ, antiproliferativ, antithrombotisch, antiinflammatorisch, antimikrobiell und antiestrogen. Zu niedrige Konzentrationen der Phytoestrogene *in vivo* könnten dagegen das Wachstum von v.a. hormonabhängigen Tumoren begünstigen [*de Lemos ML, 2001; Messina MJ et al., 2008*]. Es ist also es nicht auszuschließen, dass die Aufnahme von Phytoestrogenen für Frauen mit Brustkrebs, präkanzerogenen Veränderungen in der Brust oder einer genetischen Prädisposition kontrainduziert sein könnte. Deswegen, und auch aufgrund der Tatsache, dass Isoflavone oder ihre Metabolite genotoxisches Potential aufweisen können (siehe 1.4.5.), muss eine kritische Risiko/Nutzen-Abwägung für solche Supplemente oder Medikamente garantiert werden.

2. Zielstellung

Nach Schätzungen kommt weltweit etwa jede 5. bekannte lebende Pflanzenart als Heilpflanze in Betracht, was eine Zahl von ungefähr 80.000 möglichen Heilpflanzen bedeutet. Internationale Studien zeigen, dass zahlreiche Pflanzen hohe Anteile an bioaktiven Inhaltsstoffen enthalten, die sich positiv auf die menschliche Gesundheit auswirken. Zudem stammt bereits ein großer Teil an wirksamen Medikamenten aus Pflanzen oder wurde aus pflanzlichen Stoffen weiterentwickelt. Dies gilt auch für die Behandlung von malignen Tumorerkrankungen. Bestes Beispiel in der Gynäkologie ist das etablierte Medikament Tamoxifen, welches aus der Eibe isoliert wurde. Die Suche nach therapeutisch nutzbaren pflanzlichen Verbindungen stellt also eine zentrale Herausforderung in der medizinischen Forschung dar.

Das Interesse dieser Arbeit ist auf die Leinpflanze (*Linum usitatissimum*) gerichtet, welche ähnlich wie die Sojapflanze bekanntermaßen reich an Phytoestrogenen ist, denen eine antikanzerogene Wirkung zugesprochen wird. In Vorversuchen unserer Arbeitsgemeinschaft zeigten Extrakte aus Blättern, Stängeln und Wurzeln des Leins, getestet an verschiedenen Chorionkarzinom-, Trophoblasttumor- und Mammakarzinomzellen, signifikante Hemmungen des Zellüberlebens sowie die Induktion von Apoptose *in vitro* [Abarzua *et al.*, 2007; Szewczyk *et al.*, 2007]. Dabei schienen die Extrakte aus den Wurzeln des Leins die stärkste Wirkung zu haben.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakt hergestellt und dessen Wirkung an zwei verschiedenen humanen Mammakarzinom-Zelllinien unter *in vitro*-Bedingungen getestet. Desweiteren wurden die Effekte verschiedener einzelner Phytoestrogene, sowohl aus der Gruppe der Isoflavone (Genistein, Genistin, Daidzein und Daidzin) als auch der der Lignane (Secoisolariciresinol), auf die Karzinomzellen getestet. Als Kontrollsubstanzen wurden Tamoxifen sowie das natürliche Estrogen 17 β -Estradiol untersucht.

Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, welche Wirkungen das Wurzelextrakt als Ganzes sowie die einzelnen Phytoestrogene auf die Mammakarzinomzellen verursachen. Durch eine zuvor durchgeführte massenspektrometrische Analyse des hergestellten Extrakts wurde seine molekulare Zusammensetzung bestimmt. Dabei sollte festgestellt werden, ob und in welchem Maße Phytoestrogene in der Leinwurzel enthalten sind und es evtl. noch andere Stoffgruppen gibt, die an der Wirkung der Leinwurzel beteiligt sein könnten. Ein Vergleich zwischen den Wirkungen des Extrakts mit denen der Phytoestrogene sollte dabei zur Klärung beitragen, welche Rolle die Phytoestrogene in den Wirkungen des Extrakts spielen. Bei den

Mammakarzinom-Zelllinien wurde bewusst eine hormonabhängige (MCF-7) und eine hormonunabhängige Zelllinie (BT20) verwendet, um zusätzlich Erkenntnisse über die Beteiligung verschiedener Hormonrezeptoren ($ER\alpha$, $ER\beta$ und PR) an den Wirkmechanismen zu erlangen. Dazu wurde vor Versuchsbeginn der Rezeptorstatus der beiden Zelltypen durch immunhistochemische Methoden untersucht. Bei den Isoflavonen wurde sowohl die glykosidische als auch die aglykosidische Form der jeweiligen Substanz getestet. Durch die Untersuchung beider chemischer Varianten sollte zur Klärung der Frage beigetragen werden, ob es neben den schon bekannten Unterschieden im Metabolismus auch Unterschiede in der direkten Wirkung auf die Karzinomzellen gibt.

Um die Einflüsse des Wurzelextrakts, der Phytoestrogene und der Kontrollsubstanzen auf die Mammakarzinomzellen zu untersuchen, wurden drei verschiedene *in vitro*-Testverfahren verwendet. Dabei wurden die Zytotoxizität der Testsubstanzen sowie deren Wirkung auf die Stoffwechselaktivität und Proliferation der Karzinomzellen untersucht. Durch die Verwendung verschiedener Testmethoden mit jeweils unterschiedlichen chemischen Mechanismen und Ansatzpunkten sollten zusätzlich Rückschlüsse auf mögliche Wirkmechanismen der Testsubstanzen gezogen werden. Das Wurzelextrakt, die einzelnen Phytoestrogene und Kontrollsubstanzen wurden ausserdem in verschiedenen Konzentrationen getestet, da in der Literatur abhängig von der Dosierung unterschiedliche Effekte v.a. der Phytoestrogene im Zusammenhang mit den Karzinomzellen beschrieben werden.

3. Material und Methoden

3.1. Pflanzenextrakt

3.1.1. Pflanzenmaterial

Das verwendete pflanzliche Rohmaterial für die Herstellung des Extrakts stammte aus den Wurzeln einer Leinpflanze, Unterart Gemeiner Lein (*Linum usitatissimum*), Sorte Barbara. Die Samen wurden ursprünglich von der LUFA (Rostock) erworben und im Juni 2005 auf Erdboden ausgesät. Die Leinpflanze wuchs unter Freilandbedingungen und wurde nach 9 Wochen im August 2005 bei einer Höhe von ca. 1 m geerntet. Das Pflanzenmaterial wurde danach bei - 80 °C gelagert.

3.1.2. Extraktion nach Luyengi et al., 1996

Zu Beginn wurden die Wurzeln von den Stängeln getrennt, ungefähr auf Höhe des Farbumschlags zwischen der braunen Wurzel und dem grünen Stängel (**Abb. 12**). Es wurden 16 g Leinwurzel unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerkleinert, wobei es teilweise nicht gelang die Wurzeln vollständig zu Pulver zu zermahlen. Das so zerkleinerte Wurzelmaterial wurde in einem 2 l-Rundkolben mit 142 ml Methanol (MeOH) als Lösungsmittel sowie einem Teelöffel Glasperlen, um Siedeverzüge zu vermeiden, vermengt. Daraufhin wurde diese Suspension in einem Wasserbad bei 70 °C für 15 min unter Rückfluss gekocht (**Abb. 12**). Der wassergekühlte Rückflussmechanismus verhinderte, dass leicht flüchtige Substanzen das Gefäß verließen, indem die kondensierten Dämpfe wieder in das Reaktionsgefäß zurückflossen. Nach diesem ersten Schritt der Methanolextraktion wurde das abgekühlte Gemisch nun mit Hilfe eines Faltenfilters von den festen Bestandteilen getrennt und in einen 100 ml-Rundkolben filtriert. Danach folgte die Einengung des so entstandenen Rohextrakts mit einem Rotationsverdampfer, d.h. es wurde von seinem Lösungsmittel, dem MeOH, getrennt (**Abb. 12**). Dazu wurde der die Probe enthaltende Glaskolben unter ständiger Rotation in ein ca. 42 °C warmes Wasserbad eingetaucht, sodass das MeOH allmählich verdampfte, in einen Kühler aufstieg, dort kondensierte und anschließend in einen Auffangkolben abfloss. Zusätzlich wurde der Rundkolben mit Hilfe einer Pumpe evakuiert, d.h. der Innendruck abgesenkt, um die Siedetemperatur der Suspension zu senken, somit die Destillationsleistung zu steigern und außerdem einer eventuellen Schädigung des Gemisches durch eine zu hohe Temperatur entgegenzuwirken. Der Druck wurde hierbei langsam von anfangs ca. 300 mbar auf ca. 60 mbar verringert und die Probe bis kurz vor der Trockne eingengt. Anschließend wurde die nun an der Wand des Rundkolbens haftende Probe mit Hilfe eines Ultraschallbades

in 6 ml destilliertem Wasser gelöst und die so entstandene Lösung in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Im nächsten Schritt erfolgte das Abtrennen der Probe mit Hilfe einer Zentrifuge durch fünfmaliges Ausschütteln der Lösung mit jeweils 8 ml Ethylacetat als Lösungsmittel. Nach jedem Zentrifugieren konnte eine deutliche 2-Phasen-Trennung beobachtet werden, wobei sich die wässrige Phase aufgrund der Dichte unten absetzte. Die obere Phase enthielt das Ethylacetat mit der gewünschten Probe und wurde deshalb jeweils mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgezogen und in einen neuen Rundkolben, dessen Nettogewicht vorher bestimmt worden war, überführt. Nach erneuter Einengung am Rotationsverdampfer, diesmal bis ganz zur Trockne, wurde der Kolben über Nacht in einem Exsikkator, der Silikagel als Trockenmittel enthielt, zum Nachtrocknen dunkel aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das Bruttogewicht des Kolbens ausgewogen und schließlich das Reingewicht des Extrakts bestimmt. Die Probe wurde danach lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.



Abb. 12: von links nach rechts: Leinwurzelmaterial, Methanolextraktion im Wasserbad, Einengung des Extrakts am Rotationsverdampfer

3.1.3. Aufarbeitung des Extrakts

Das nach *Luyengi et al. (1996)* hergestellte Wurzelextrakt (58,7 mg) wurde mit Hilfe eines Ultraschallbades von der Kolbenwand gelöst und in unvergälltem Ethanol 96 % (EtOH) aufgenommen. Dabei wurden pro mg Extrakt 10 µl EtOH verwendet, sodass eine Stammlösung des Extrakts von insgesamt 590 µl mit einer Konzentration von 100 mg/ml entstand.

Aus dieser Stammlösung wurden schließlich weitere Verdünnungen durch Zugabe von EtOH gefertigt. Um eine Veränderung des Extrakts durch äußere Einflüsse, wie Temperatur, Licht und Sauerstoff möglichst gering zu halten, wurde die Stammlösung der Probe bei - 83 °C lichtgeschützt tiefgekühlt. Die Verdünnungsreihen wurden in kleinen Kryo-Röhrchen bei - 20 °C gelagert und nur zum Zwecke der laufenden Experimente entnommen. Um eventuellen

Änderungen in der Zusammensetzung durch Alterungsprozesse und Verdunstungen der alkoholischen Bestandteile möglichst auszuschließen, wurden die Verdünnungsreihen jeweils nach ca. 4-8 Wochen erneuert.

3.2. Phytoestrogene und Kontrollsubstanzen

3.2.1. Isoflavone und Lignane

Die in dieser Arbeit untersuchten Isoflavone (Genistein, Genistin, Daidzein, Daidzin) und Lignane (Secoisolariciresinol) wurden in industriell gefertigter, pulverisierter Form erworben. Dabei handelt es sich bei Genistein und Daidzein um Aglykone, bei Genistin und Daidzin dagegen um das entsprechende Glykosid. Nach Abwiegen der Phytoestrogene mit Hilfe einer elektrischen Feinwaage wurden diese ebenfalls jeweils in EtOH gelöst und so in Stammlösungen mit einer Konzentration von jeweils 5 mg/ml überführt.

3.2.2. Tamoxifen und 17 β -Estradiol

Neben dem *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakt und den Phytoestrogenen wurden außerdem noch zwei Kontrollsubstanzen untersucht: Tamoxifen und 17 β -Estradiol. Diese wurden, ebenfalls industriell gefertigt und in Pulverform erworben, gleichermaßen wie oben beschrieben jeweils zu einer Stammlösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml verarbeitet.

3.2.3. Aufarbeitung der Phytoestrogene und Kontrollsubstanzen

Bei allen in Pulverform verwendeten Stoffen wurde beim Lösevorgang darauf geachtet, dass sich das Pulver vollständig im EtOH löste. Dazu wurde teilweise ein Reagenzglasschüttler zu Hilfe genommen. Manchmal half es auch durch leichte Erwärmung der Suspension die Löslichkeit zu verbessern. Wie auch bei dem Wurzelextrakt wurden aus den jeweiligen Stammlösungen weitere Verdünnungen durch Zugabe von EtOH hergestellt, und diese wie oben beschrieben behandelt.

3.3. Zellkulturen

3.3.1. Mammakarzinom-Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene humane Mammakarzinom-Zelllinien verwendet: MCF-7 und BT20 (**Abb. 13**). Bei MCF-7 handelt es sich um eine in der Brustkrebsforschung häufig verwendete, hormonabhängige, epitheliale Adenokarzinomzelllinie einer kaukasischen

69-jährigen Frau, gewonnen im Jahre 1970. BT20 dagegen ist eine hormonunabhängige, duktale Mammakarzinomzelllinie, die zwar ER-mRNA exprimiert, jedoch aufgrund einer Deletion auf Exon 5 keinen Rezeptor ausbildet [Castles CG *et al.*, 1993]. Auch sie stammt von einer kaukasischen Frau, gewonnen im Jahre 1958. Beide Zelllinien wurden kommerziell erworben und zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei - 188 °C gelagert.

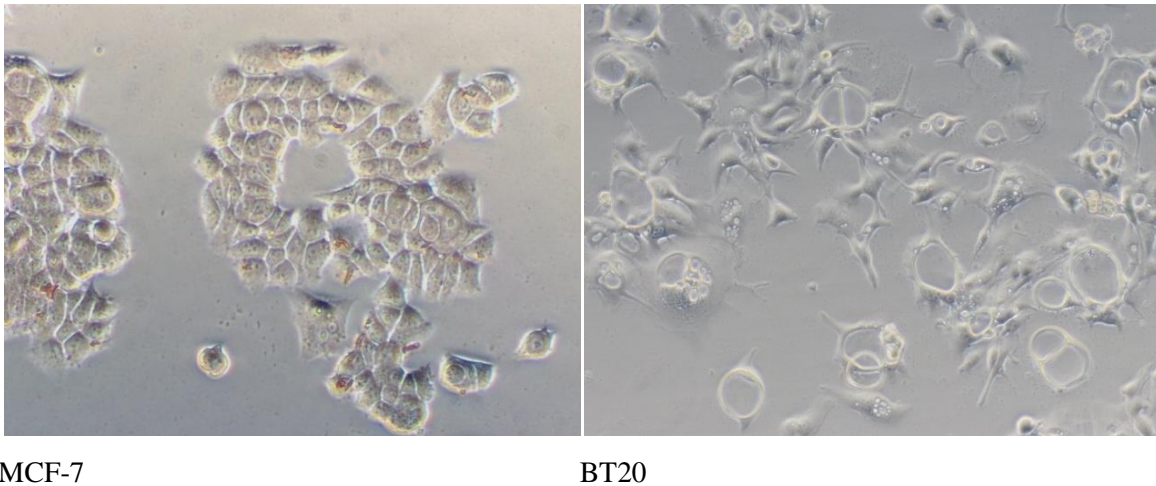


Abb. 13: Lichtmikroskopische Nativbilder der Zelllinien MCF-7 und BT20 in Zellkultur (100-fache Vergrößerung)

3.3.2. Zellkulturmedien

MCF-7 wurde in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), BT20 dagegen in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) kultiviert. Beide Medien wurden selbst hergestellt, steril filtriert und der pH-Wert auf ca. 7,4 eingestellt. Sie enthalten jeweils 2 mM L-Glutamin, 1,5 g/l Natriumbicarbonat, 4,5 g/l Glucose, 10 mM HEPES, 1 mM Natrium-Pyruvat (90 %) sowie weitere anorganische Salze, Aminosäuren und Vitamine. Der Farbstoff Phenolrot gibt beiden Medien ihre charakteristische rote Farbe. Außerdem wurde beiden Medien jeweils 10 % inaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,5 % Amphotericin hinzugefügt. FKS liefert den Zellen u.a. Wachstumsfaktoren, Spurenelemente und Hormone, was für das Zellwachstum unerlässlich ist. Die Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) sollen das Bakterienwachstum, das Fungizid (Amphotericin) das Pilzwachstum verhindern. Die Medien wurden im Kühlschrank bei ca. 4 °C gelagert.

3.3.3. Zellkultivierung

In tiefgefrorenem Zustand waren die Zellen in 1,5 ml Nährmedium, versetzt mit 20 % FKS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), in einer Konzentration von ca. 1×10^6 /ml bei - 80 °C

gelagert. Nach dem Auftauen mussten sie in reines Nährmedium überführt werden, da das DMSO eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen hat. Dazu wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 15 ml des jeweiligen Nährmediums pipettiert, mit dem Reagenzglasschüttler durchmengt und anschließend bei 1000 rpm ohne Bremse für 5 min zentrifugiert, sodass sich die Zellen am Boden des Röhrchens als Zellpellet absetzten. Der Überstand wurde daraufhin abdekantiert, die Zellen in 5 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und nach einer kurzen Aufschüttelung durch den Reagenzglasschüttler in die kleinste Zellkulturflasche überführt. Da es sich bei beiden Zelllinien um adhärente Zellen handelt, wachsen diese als Monolayer auf dem Boden von Zellkulturflaschen. Die Kulturflaschen sind an ihrer mit einem Schraubdeckel verschließbaren Öffnung mit einem Filter versehen, der zwar den Gasaustausch gewährleistet, den Flascheninhalt aber vor von außen eindringenden Mikroorganismen schützt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

Entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen ungefähr jeden zweiten Tag mit frischem Nährmedium versetzt. Bei Besiedlung des Flaschenbodens von mindestens 80 % wurden die Zellen passagiert. Da die Zellen über Peptidbindungen am Boden der Zellkulturflaschen hafteten, mussten diese mit Hilfe von Trypsin-EDTA, welches verschiedene Peptidasen enthält, enzymatisch gelöst werden. Dazu wurde das Nährmedium vollständig abpipettiert und je nach Flaschengröße ca. 5-10 ml PBS für ca. 30 sek hinzugegeben, um das proteinhaltige FKS von den Zellen abzuwaschen. Dadurch sollte erreicht werden, dass sich das Trypsin nicht an das FKS, sondern an die Zellen anlagerte. Anschließend wurde ca. 5-10 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben und die Flasche für 5-10 min im Brutschrank inkubiert, sodass sich die Zellen vom Flaschenboden ablösten. Zuletzt wurden ca. 8-15 ml DMEM zum Neutralisieren hinzugegeben, um eine Zerstörung der Zellen durch das Trypsin zu verhindern. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und nach Zentrifugation erneut in Nährmedium resuspendiert.

Je nach Bedarf konnte die Zellsuspension dann als neue Passage in frische Zellkulturflaschen ausgesät werden und/oder für die verschiedenen Untersuchungen (siehe später) genutzt werden.

3.3.4. Ermittlung der Lebendzellzahl

Da alle Experimente mehrfach durchgeführt wurden, sollten diese natürlich möglichst unter gleichen Bedingungen ablaufen. Deshalb war es wichtig, die Zellzahl der jeweiligen Zellsuspension zu bestimmen. Es soll darauf hingewiesen werden, dass für die in dieser Arbeit

durchgeführten Versuche immer nur die Lebendzellzahl bestimmt wurde. Für die Zellzählung wurde eine „Bürker-Zählkammer“ verwendet (**Abb. 14**). Die Zählung erfolgte nach folgendem Schema:

- 1.) 360 µl Nährmedium in einem kleinen Eppendorfröhrchen vorlegen
- 2.) 20 µl Trypanblau in das Röhrchen pipettieren (der Azofarbstoff dringt bei defekter Zellmembran in das Innere der Zellen ein und färbt sie blau; lebende Zellen erscheinen farblos, plastisch und leuchtend hell → Unterscheidung zwischen toten und lebendigen Zellen)
- 3.) 20 µl der zu bestimmenden Zellsuspension dazugeben → Verdünnung von 1:20
- 4.) Mit dem Reagenzglasschüttler kurz vermengen
- 5.) Auf beiden Seiten der Kammer jeweils ca. 10 µl der angefärbten Suspension auftragen (Suspension wandert durch Kapillarwirkung getrieben ins Zählnetz der Kammer)
- 6.) Lichtmikroskopische Auszählung der lebendigen Zellen aus jeweils 25 kleinen Quadraten beider Seiten der Kammer
- 7.) Berechnung der Lebendzellzahl pro ml:
→ **Zellen/ml = gezählte Zellzahl (aus 2 x 25 Quadraten) x 10 x 10⁴**
- 8.) Gegebenenfalls weitere Verdünnung auf die gewünschte Zellzahl/ml

Tab. 4: Vorgehensweise zur Berechnung der Lebendzellzahl in einer Zellsuspension

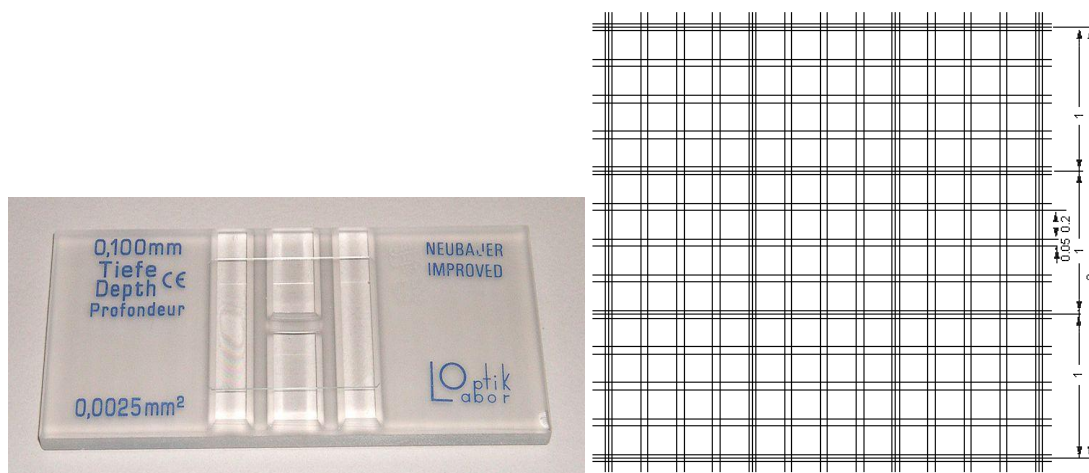


Abb. 14: Bürker-Zählkammer (*links*), Ausschnitt des Zählnetzes unter dem Mikroskop (*rechts*)

3.4. Testverfahren

3.4.1. Testvorbereitungen und -konditionen

Um die Ergebnisse innerhalb der jeweiligen Untersuchungsmethode, aber auch zwischen den beiden verschiedenen Zelllinien vergleichen zu können, wurde soweit möglich immer die gleiche Menge an Zellen pro Experiment eingesetzt. Die optimale Zellzahl für die verwendeten Testverfahren und Zelllinien wurde bereits in früheren Versuchen unseres Forschungslabors bestimmt. Eine zu hohe Zelldichte könnte sich negativ auf das Wachstum auswirken, indem keine Zellproliferation mehr möglich ist. Dagegen könnte bei einer zu geringen Zelldichte das Wachstum der Zellen beeinträchtigt sein, weil gerade die Tumorzelllinien zur Proliferation den Kontakt zueinander benötigen. Ergebnis dieser Untersuchungen war eine optimale Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml, d.h. dass nach einer Inkubationszeit von 24 h eine Konfluenz von ca. 80 % besteht [Szewczyk M, 2007].

Die folgenden Testverfahren wurden jeweils auf 96-Wellplatten unter sterilen Bedingungen durchgeführt (**Abb. 15**). Alle untersuchten Substanzen wurden jeweils in einem Verhältnis von 1:100 in die Wells gegeben, sodass sich folgende Endkonzentrationen auf die Zellen ergaben:

<i>Linum usitatissimum</i>-Wurzelextrakt	0,01 - 0,1 - 1 - 10 - 50 - 100 - 500 - 1000 µg/ml
Phytoestrogene Genistein, Genistin, Daidzein, Daidzin, Secoisolariciresinol	jeweils 1 - 5 - 10 - 50 µg/ml
Kontrollsubstanzen Tamoxifen, 17β-Estradiol	jeweils 1 - 5 - 10 - 50 µg/ml

Tab. 5: Endkonzentrationen der getesteten Substanzen auf die Zellen

Desweiteren wurden auf jeder Wellplatte Kontrollen mitgeführt: eine Hintergrundkontrolle (Blindwert), die nur das jeweilige Nährmedium ohne Zellen enthielt, und zwei Negativkontrollen, zum einen Zellen in ihrem jeweiligen Medium (Negativkontrolle 1) und zum anderen Zellen in ihrem jeweiligen Medium mit EtOH, dem Lösungsmittel aller oben hergestellten Lösungen (Negativkontrolle 2). Die Endkonzentration von EtOH auf den Zellen überstieg nie 1 %, weder in der Negativkontrolle 2, noch in irgendeinem der Wells mit den zu testenden Substanzen. Für die LDH-Tests wurde zusätzlich noch eine Triton-Kontrolle auf jeder Platte mitgeführt. Dazu wurde Triton X-100 in einer Konzentration von 1 %, gelöst im jeweiligen Nährmedium, zu den Zellen gegeben.

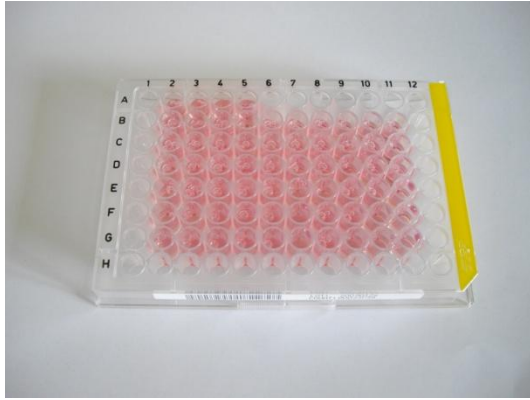


Abb. 15: 96-Wellplatte, beimpft mit Zellsuspension (Zellen + Nährmedium)

3.4.2. LDH-Zytotoxizitätstest

Mit Hilfe dieses Verfahrens lässt sich der Zelltod und somit die Zytotoxizität des jeweils untersuchten Stoffes quantitativ bestimmen.

Testprinzip

Der Test basiert auf der Messung der LDH-Aktivität im Überstand toter Zellen, da diese nach dem Tod durch Zellmembranschäden ihren Zellinhalt in das Kulturmedium abgeben. Die Messung der ubiquitären LDH ist sehr gut geeignet, da sie stabil im Kulturmedium vorliegt, gegen den Abbau durch Proteasen resistent ist und in ausreichender Menge in beiden der hier verwendeten Tumorzelllinien vorkommt.

Das Enzym LDH katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat mit gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$. Diese Enzymaktivität wird mit Hilfe einer zweiten enzymatischen Reaktion bestimmt. Dafür wird das Enzym Diaphorase sowie das Tetrazoliumsalz INT hinzugegeben. Die Diaphorase katalysiert die Reduktion des gelben INT zu einem roten Formazansalz, während gleichzeitig $\text{NADH} + \text{H}^+$ wieder zu NAD^+ zurückoxidiert wird (**Abb. 16**). Die so entstandene Formazanfärbung kann nun am ELISA-Reader photometrisch quantifiziert werden. INT zeigt bei der entsprechenden Wellenlänge keine signifikante Absorption und kann daher als Störfaktor ausgeschlossen werden. Die Menge des gebildeten Formazans ist also proportional zu der Anzahl toter Zellen.

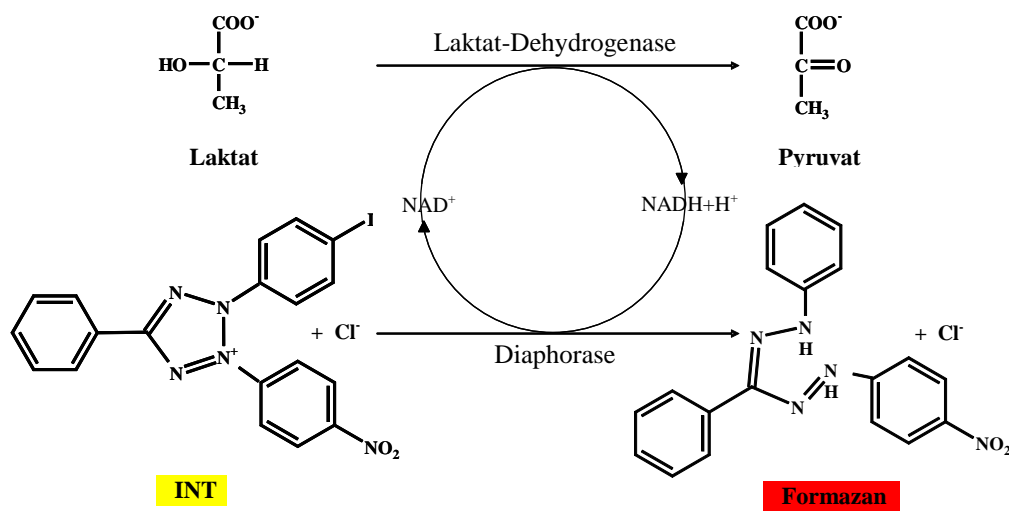


Abb. 16: Chemische Reaktionen des LDH-Tests

Durchführung (Zusammenfassung der Arbeitsschritte)

1. Zellkultivierung: 100 µl/Well Zellsuspension (5×10^5 Zellen/ml) in 96-Wellplatte – 24 h Inkubation im Brutschrank
2. Mediumwechsel: Überstand (altes Medium) wird abgenommen und durch 198 µl/Well Medium mit 1 % FKS + 2 µl/Well Experimentieransatz (Wurzelextrakt, Phytoestrogene, Kontrollsubstanzen, Kontrollen, Triton-Kontrollen) ersetzt (→ 1:100 Verdünnung) – 4 h Inkubation im Brutschrank
3. 100 µl/Well Überstand in neue 96-Wellplatte
4. 100 µl/Well „Reaction-Mixture“ (Diaphorase/NAD⁺) auf den Überstand – 10 bis 30 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur
5. Abstoppen der Reaktion mit 50 µl/Well 1 N HCl
6. Messung der Extinktionen am ELISA-Reader bei 490 nm; Referenz: 520 nm

Tab. 6: Durchführung des LDH-Tests

Auswertung

Das hoch zytotoxische Triton ist ein Zellgift und verursacht, indem es alle Zellen lysiert, die maximale LDH-Aktivität im Überstand, entspricht also einer Zellletalität von 100 %. Setzt man die Absorptionswerte der mit den getesteten Substanzen bzw. Kontrollen behandelten Wells in Relation zu denen der mit Triton behandelten Wells, lässt sich die Prozentzahl der durch die zu testenden Substanzen bzw. Kontrollen getöteten Zellen errechnen. Um Störungen durch das jeweilige Nährmedium und das Lösungsmittel EtOH auszuschließen, wurde

von den Absorptionswerten der Testsubstanzen die Negativkontrolle 2 abgezogen, von den Absorptionswerten des Triton jedoch nur die Negativkontrolle 1, da die Tritonkontrolle kein EtOH enthält. Zur Berechnung der Anzahl toter Zellen wurde schließlich folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellletalität (\%)} = \frac{\text{Ext. der Probe} - \text{Ext. der Neg.kontrolle2}}{\text{Ext. der Tritonkontrolle} - \text{Ext. der Neg.kontrolle1}} \times 100$$

Zuvor wurde durch verschiedene Messungen festgestellt, dass sowohl die untersuchten Substanzen bzw. ihre Lösungen als auch die Nährmedien und Lösungsmittel weder eine eigene LDH-Aktivität besitzen noch mit der LDH-Aktivität interferieren.

3.4.3. MTT-Zellvitalitäts/-proliferationstest

Durch diese Testmethode werden die Vitalität metabolisch aktiver Zellen sowie deren Zellproliferation quantifiziert.

Testprinzip

Das Prinzip beruht auf der Spaltung des zu den Zellen hinzugefügten gelben Tetrazoliumsalzes MTT in einen violetten Formazan-Farbstoff (**Abb. 17**). Diese Reaktion wird durch mitochondriale Dehydrogenasen des Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems katalysiert. Da diese Enzyme nur in vitalen Zellen aktiv sind, dient die Umwandlung von MTT zu Formazan als Maß für die Vitalität und Proliferation lebendiger Zellen. Die Intensität der Farbänderung ist also proportional zur Anzahl der Zellen und deren Stoffwechselaktivität. Die Absorption des entstandenen Formazans kann photometrisch mit Hilfe eines ELISA-Readers bestimmt werden, weil das Substrat MTT in dem entsprechenden Bereich nicht absorbiert. Da aber das Formazan in wässriger Lösung leicht kristallisiert und nicht wasserlöslich ist, müssen diese Kristalle vor der Messung durch Zugabe von Lösungsmitteln vollständig gelöst werden.

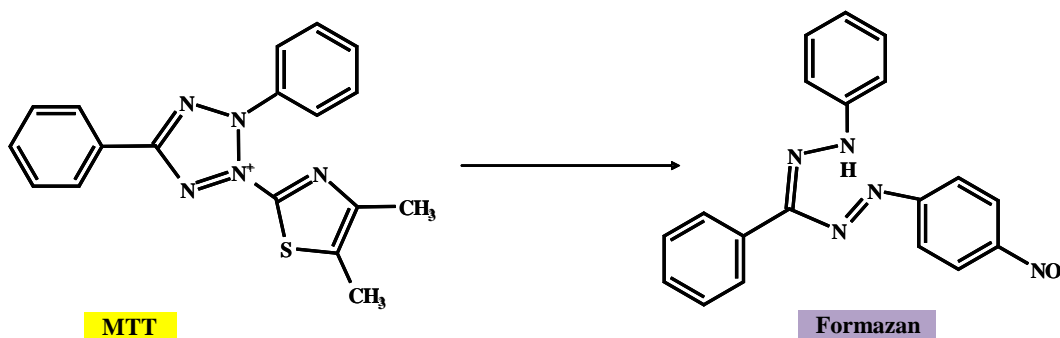


Abb. 17: Chemische Reaktion des MTT-Tests

Durchführung (Zusammenfassung der Arbeitsschritte)

1. Zellkultivierung: 100 µl/Well Zellsuspension (5×10^5 Zellen/ml) in 96-Wellplatte – 24 h Inkubation im Brutschrank
2. Kein Mediumwechsel; 1 µl/Well Experimentieransatz (Wurzelextrakt, Phytoestrogene, Kontrollsubstanzen, Kontrollen) dazu (→ 1:100 Verdünnung) – 24 h Inkubation im Brutschrank
3. 10 µl/Well MTT-Reagenz dazugeben – 4 h Inkubation im Brutschrank
4. 100 µl/Well Solubilisierungslösung (Lösen der Kristalle) – Inkubation über Nacht im Brutschrank
5. Messung der Extinktionen am ELISA-Reader bei 570 nm; Referenz: 650 nm

Tab. 7: Durchführung des MTT-Tests

Auswertung

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgemeinschaft sowie aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass EtOH in den hier verwendeten Konzentrationen (≤ 1 %) keine Effekte auf die Zellen hat. Somit wurde die Negativkontrolle 2 (Zellsuspension + EtOH) für die Darstellung der Zellvitalität und -proliferation auf 100 % gesetzt. Setzt man die Absorptionswerte der mit den getesteten Substanzen bzw. Kontrollen behandelten Zellen in Relation zu denen der Negativkontrolle 2, ergibt sich somit die Prozentzahl der Zellproliferation/ -vitalität der behandelten Zellen. Um Störungen durch das jeweilige Nährmedium auszuschließen, wurde von den Absorptionswerten die Hintergrundkontrolle abgezogen. Folgende Formel wurde zur Berechnung der Ergebnisse verwendet:

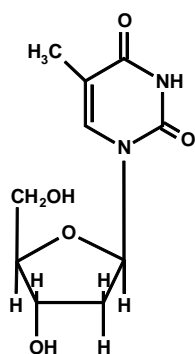
$$\text{Zellproliferation/ -vitalität (\%)} = \frac{\text{Ext. der Probe} - \text{Ext. des Blindwerts}}{\text{Ext. der Neg.kontrolle2} - \text{Ext. des Blindwerts}} \times 100$$

3.4.4. BrdU-Zellproliferationstest

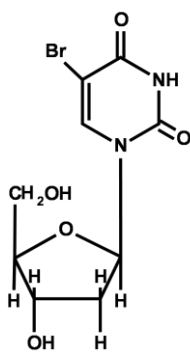
Bei diesem Testverfahren handelt es sich um einen Immunassay zur quantitativen Bestimmung der Zellproliferation.

Testprinzip

Der Test basiert auf dem Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) anstelle der regulären DNA-Base Thymidin in die DNA proliferierender Zellen (**Abb. 18**). Dieses Thymidinanalogon wird in der Synthese-Phase des Zellzyklus, in der die DNA repliziert wird, durch die DNA-Polymerase in die neue DNA eingebaut. Nach anschließender Fixierung der Zellen und einer damit verbundenen Denaturierung der DNA werden BrdU-Antikörper (AK) hinzugegeben, die schließlich an das BrdU der neu synthetisierten zellulären DNA binden. Es handelt sich dabei um monoklonale AK von Maus-Maus-Hybridzellen, die mit einer Peroxidase konjugiert sind. Die dadurch entstandenen Immunkomplexe werden immunhistochemisch mit Hilfe einer Substratreaktion mit Farbumschlag gemessen. In diesem Fall handelt es sich bei dem verwendeten Substrat um TMB. Die Absorption des Reaktionsprodukts wird photometrisch gemessen, wobei die Farbintensität mit der Menge der neu synthetisierten DNA und dementsprechend mit der Anzahl proliferierender Zellen korreliert.



Thymidin



5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)

Abb. 18: Prinzip des BrdU-Tests: Einbau von BrdU anstelle von Thymidin in die DNA

Durchführung (Zusammenfassung der Arbeitsschritte)

1. Zellkultivierung: 100 µl/Well Zellsuspension (5×10^5 Zellen/ml) in 96-Wellplatte – 24 h Inkubation im Brutschrank
2. Kein Mediumwechsel; 1 µl/Well Experimentieransatz (Wurzelextrakt, Phytoestrogene, Kontrollsubstanzen, Kontrollen) dazu (→ 1:100 Verdünnung) – 24 h Inkubation im Brutschrank

3. 10 µl/Well BrdU (gelöst in Nährmedium 1:100) dazugeben – 3 h Inkubation im Brutschrank, danach Entfernen der BrdU-Lösung
4. 200 µl/Well „Fix-Denat“ dazugeben – 30 min Inkubation bei Raumtemperatur, danach Entfernen des „Fix-Denats“
5. 100 µl/Well „Anti-BrdU-POD working solution“ (AK) dazugeben – 1 h Inkubation bei Raumtemperatur, danach Entfernen des Anti-BrdU-POD
6. Entfernen der AK durch 3 x Waschen mit ca. 200 µl/Well „Washing-solution“ (gelöst in destilliertem Wasser 1:10), danach Entfernen des Waschpuffers
7. 100 µl/Well „Substrate-solution“ (Farbsubstrat) dazugeben – 15 min Inkubation bei Raumtemperatur
8. Abstoppen der Farbreaktion mit 25 µl/Well 1 M H₂SO₄ – ca. 1 min warten vor Messung
9. Messung der Extinktionen am ELISA-Reader bei 450 nm; Referenz: 620 nm

Tab. 8: Durchführung des BrdU-Tests

Auswertung

Ebenso wie beim MTT-Test wurde die Negativkontrolle 2 für die Darstellung der Zellproliferation auf 100 % gesetzt und die Absorptionswerte der mit den Testsubstanzen behandelten Zellen in Relation dazu gesetzt. Ergebnis ist die Prozentzahl der Zellproliferation der behandelten Zellen. In Vorexperimenten wurde durch verschiedene Kontrollen festgestellt, dass es weder eine unspezifische Bindung von BrdU und Anti-BrdU-POD an die Wellplatte noch eine unspezifische Bindung von Anti-BrdU-POD an die Zellen in Abwesenheit von BrdU gab. Um Störungen durch die Nährmedien auszuschließen, wurde von den Absorptionswerten die Hintergrundkontrolle abgezogen. Folgende Formel wurde zur Berechnung der Ergebnisse verwendet:

$$\text{Zellproliferation (\%)} = \frac{\text{Ext. der Probe} - \text{Ext. des Blindwerts}}{\text{Ext. der Neg.kontrolle2} - \text{Ext. des Blindwerts}} \times 100$$

3.5. Immunhistochemie

Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden wurde der Hormonrezeptorstatus (ER α , ER β und PR) beider in dieser Arbeit verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien untersucht.

Als Zellkulturträger wurde pro Zelllinie jeweils eine 24-Wellplatte verwendet, pro Rezeptortyp jeweils 3 Wells, zwei für den Rezeptornachweis und eins für die Negativkontrol-

le. In jedes Well wurden 300 µl der jeweiligen Zellsuspension mit einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml pipettiert. Danach wurden die Wellplatten für 48 h im Brutschrank inkubiert, um eine vollständige Adhärenz der Zellen am Boden der Platten zu gewährleisten. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abdekantiert und es folgte eine Fixierung der Zellen mit 4 % Formalin für je 20 min. Anschließend wurden alle Wells zweimal hintereinander mit PBS für jeweils 5 min gewaschen. Um die endogene Peroxidaseaktivität der Zellen auszuschalten, wurde auf die Zellen 0,3 % H_2O_2 für 30 min gegeben und anschließend wieder 2 mal mit PBS gespült. Nach Entfernung des PBS wurde pro Well jeweils 300 µl Normalserum vom Pferd hinzugegeben, um das spätere Anheften der Primär-AK an Kunststoffbestandteile der Wellplatte zu verhindern. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurde das Normalserum abdekantiert. Als nächstes erfolgte die Zugabe der spezifischen Primär-AK (ER α , ER β und PR). Es wurden ca. 100 µl der jeweiligen AK-Lösung pro Well hinzugegeben. Bei den AK handelte es sich um Maus-AK. Für die Negativkontrollen wurde anstelle der jeweiligen Primär-AK erneut Normalserum auf die Zellen gegeben. Die Wellplatten wurden schließlich für 24 h im Kühlschrank bei ca. 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte erneut ein zweimaliger Waschvorgang aller Wells mit PBS für jeweils 5 min. Anschließend wurden die Wellplatten für 30 min bei Raumtemperatur mit „ImmPRESSreagent“, einer Lösung, die Mikropolymere aus einer sehr aktiven Peroxidase, gekoppelt mit einer Mischung aus Anti-Maus- und Anti-Hase-AK (Sekundär-AK) enthält, inkubiert. In diesem Schritt wurden somit die mit einer Peroxidase verknüpften Sekundär-AK an die Primär-AK gebunden. Anschließend wurden erneut zwei Waschzyklen mit PBS für jeweils 5 min durchgeführt. Im letzten Schritt erfolgte schließlich das immunhistochemische Färbeverfahren. Dazu wurden als Substrat für die Peroxidase pro Well ca. 5 Tropfen des sensitiven Chromogens „LinRed“ dazugegeben und die Wellplatten anschließend für ungefähr 10-15 min unter Sichtkontrolle bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Peroxidasereaktion entstand ein rotes Farbprodukt. Um die Färbereaktion zu stoppen, wurden die Wells abdekantiert und danach mit H_2O gespült. Das Ergebnis konnte anschließend unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert werden.

3.6. Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie

Um die molekular-chemische Zusammensetzung des hergestellten Wurzelextrakts (100 mg/ml) zu analysieren, wurde die Methode der Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie (Py-FIMS) angewendet. Dazu wurde ein doppelfokussierendes

Sektorfeld-Massenspektrometer (Finnigan MAT 900) verwendet (**Abb. 19**). Vor Beginn der Messungen erfolgte eine Signalloptimierung mit Aceton.

Zur Analyse der Leinwurzel wurden ungefähr 5 μl (= 500 μg) des hergestellten Extrakts in einen Quarztiegel eingebracht, dieser daraufhin in den Mikroheizer einer Probenschubstange transferiert und auf diesem Weg schließlich in die Ionenquelle des Spektrometers eingeführt. Hier erfolgte in einem Hochvakuum (6×10^{-6} mbar) die thermische Pyrolyse der Probe in ihre chemischen Untereinheiten. Dabei wurde die Probe stufenweise von 110 bis 700 °C mit einer Heizrate von 0,9 K/sek erhitzt. Die durch den thermischen Abbau entstandenen gasförmigen Moleküle wurden in einem durch eine Feldionisationsstange erzeugten elektrischen Feld (FI Emitter: + 4,8 kV, Gegenelektrode: -5,5 kV) schonend ionisiert. Anschließend wurden die Moleküle in einem Analysator, ebenfalls in einem Hochvakuum (10^{-8} mbar), beschleunigt, hinsichtlich ihres Masse/Ladungszahl-Verhältnisses (m/z) aufgetrennt, elektrisch verstärkt und von einem Detektor, der die Intensität der erzeugten Ionen misst, registriert. Während der Aufheizphase wurden 91 Scans durchgeführt (entspricht 6,66 K je Scan), d.h. es wurden 91 einzelne Massenspektren von 15 bis 900 Dalton aufgenommen. Als Ergebnis wurde ein Massenspektrum erstellt, aus dem hervorgeht, welche Ionen in welchen relativen Mengen gebildet worden sind. Die Werte wurden schließlich in einem Thermogramm mit den verschiedenen Massenspektren und den dazugehörigen Anteilen in % der totalen Ionenintensität (TII) zusammengefasst. Die entstandenen Werte wurden daraufhin mit verschiedenen Datenbanken verglichen und so je nach Molekülgewicht 14 verschiedenen chemischen Substanzklassen zugeordnet.

Kurze Reaktionszeiten, kleine Substanzmengen, die schonende Ionisierung im sehr hohen elektrischen Feld und die unmittelbare Zuführung der Molekülionen zum Massenspektrometer begünstigten die Bildung und Detektion primärer thermischer Bruchstücke, die sich mit der Struktur der zu untersuchenden Substanz korrelieren ließen. Um die Genauigkeit der Ergebnisse zu verbessern, wurde die Analyse des Extrakts zweimal durchgeführt und die Werte anschließend statistisch gemittelt.



Abb. 19: Massenspektrometer (Finnigan MAT 900)

3.7. Statistische Auswertung

Der Versuchsaufbau in dieser Arbeit basierte auf einer viermaligen Wiederholung jedes der drei Testverfahren (LDH-, MTT- und BrdU-Test) pro zu testender Substanz. Dabei wurden immer mindestens zwei verschiedene Passagen der jeweiligen Zelllinie benützt. Innerhalb eines Testansatzes wurde für jede Stoffkonzentration eine Vierfachbestimmung durchgeführt, also immer jeweils vier Wells verwendet. Zudem wurden auf jeder Platte die oben genannten Kontrollen (Hintergrundkontrolle, Negativkontrolle 1 und 2, ggf. Triton-Kontrolle) mitgeführt. Auf einer Platte fanden bis zu drei der getesteten Substanzen mit ihren jeweiligen Konzentrationen Platz.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde von jeder Wellplatte aus den vier errechneten Werten jeder Testsubstanz und -konzentration der Mittelwert gebildet. Die entstandenen vier Mittelwerte der einzelnen Platten wurden anschließend erneut gemittelt und dazu deren Standardabweichung berechnet. Schlussfolgernd repräsentiert jeder Balken in den Diagrammen (siehe später) den Mittelwert \pm Standardabweichung von vier Experimenten.

Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Student's t-Test (Excel, Microsoft), um die Signifikanz der Ergebnisse bezüglich der Triton-Kontrolle (LDH-Test) bzw. der Negativkontrolle 2 (MTT- und BrdU-Test) zu ermitteln. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Tritonkontrolle bzw. Negativkontrolle 2 und sind in den Diagrammen mit einem Sternchen (*) über den jeweiligen Balken gekennzeichnet.

3.8. Chemikalien und Materialien

Anwendung	Chemikalien und Materialien
Extraktion nach Luyengi et al. (1996)	<p><u>Chemikalien:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Methanol; ROTH, Karlsruhe ▪ Ethylacetat; Merck KGaA, Darmstadt <p><u>Materialien:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lein (<i>Linum usitatissimum</i>), Sorte <i>Barbara</i>; LUFA, Rostock ▪ Faltentrichter (Durchmesser 185 mm); Schleicher und Schuell GmbH, Dassel ▪ Vakuum-Rotationsverdampfer (VV2011); Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach ▪ Ultraschallbad: Sonorex; SCHALLTEC GmbH, Mörfelden-Walldorf
Aufarbeitung des Extrakts, der Phytoestrogene und Kontrollen	<p><u>Chemikalien:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ethanol 96 % unvergällt; ROTH, Karlsruhe ▪ Genistein; ROTH, Karlsruhe ▪ Genistin; ROTH, Karlsruhe ▪ Daidzein; ROTH, Karlsruhe ▪ Daidzin; ROTH, Karlsruhe ▪ Secoisolariciresinol; Fluka Chemie AG (BioChemica), Buchs, Schweiz ▪ 17β-Estradiol; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen ▪ Tamoxifen; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen <p><u>Materialien:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Präzisionswaage; Sartorius AG, Göttingen ▪ Kryo-Röhrchen (2 ml); TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkultivierung	<p><u>Zelllinien:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ MCF-7; DSMZ GmbH, Braunschweig ▪ BT20; DSMZ GmbH, Braunschweig <p><u>Chemikalien:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ DMEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Herstellung (2 l): 26,89 g DMEM + 5,2 g Hepes + 6 g Natriumhydrogencarbonat in 2 l destilliertem Wasser ▪ RPMI; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Herstellung (2 l): 32,72 g RPMI + 4 g Natriumhydrogencarbonat in 2 l destilliertem Wasser ▪ HEPES; Merck KGaA, Darmstadt ▪ Natriumhydrogencarbonat; Merck KGaA, Darmstadt ▪ Fetales Kälberserum; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich ▪ Penicillin/Streptomycin; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich ▪ Amphotericin B; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich ▪ DMSO; G. Vogler B.V., Rotterdam, Niederlande ▪ PBS (phosphatgepufferte NaCl-Lösung), 10 mM, pH = 7,4 (8,0 g NaCl + 2,9 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O + 0,2 g NaH₂PO₄ + 0,2 g KCl/1,0 l Aqua dest.); Lonza BioWhittaker, Wuppertal ▪ Trypsin-EDTA; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich ▪ Bacillol AF (Desinfektionsmittel); BODE Chemie GmbH &

	<p>Co. KG, Hamburg</p> <ul style="list-style-type: none"> Trypanblau (0,4 %); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen <p><u>Materialien:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Sterilbox; Heraeus Instruments GmbH, Hanau Zellkulturflaschen (25, 75, 150 cm²); TPP AG, Trasadingen, Schweiz Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml); TPP AG, Trasadingen, Schweiz Zentrifuge; Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂); Heraeus Instruments GmbH, Hanau Pipetten; Eppendorf, Hamburg Kühltruhe (-80 °C); Heraeus Instruments GmbH, Hanau Reagenzglasschüttler (Heidolph REAX 2000); Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach Lichtmikroskop: Olympus CK-2 TR; Olympus Europa GmbH, Hamburg Bürker-Kammer (Tiefe: 0,1 mm; 0,0025 m²); Poly-Optik GmbH, Bad Blankenburg
Testverfahren	<p><u>Detection-Kits:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Cytotoxicity Detection Kit (LDH); Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Cell Proliferation Kit I (MTT); Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric); Roche Diagnostics GmbH, Mannheim <p><u>Chemikalien:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Triton X-100 (Octoxinol-9); Ferak Berlin GmbH, Berlin 1 N HCl (= 100 ml H₂O + 8,33 ml HCl konz.); ROTH, Karlsruhe 1 M H₂SO₄; ROTH, Karlsruhe <p><u>Materialien:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Zellkultur Testplatte (96 Wells); TPP AG, Trasadingen, Schweiz ELISA-Reader (Model 680 Microplate Reader); Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA Microplate Manager Software (Vers. 5.2.1); Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA
Immunhistochemie	<p><u>Chemikalien:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Formafix 4 % (gew.) (pH 7,0), gepuffert; Grimm med. Recycling GmbH, Torgelow ImmPRESS Universal Reagent (anti-mouse/rabbit Ig, peroxidase); Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA Histoprime LinRed (R.T.U.); LINARIS GmbH, Wertheim-Bettingen <p><u>Antikörper:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Progesteronrezeptor: Monoclonal Mouse Anti-Human, PgR 636, r.t.u.; DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg Estrogenrezeptor α: Monoclonal Mouse Anti-Human, Clone: 1D5, r.t.u.; DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estrogenrezeptor β: Monoclonal Mouse Anti-Oestrogen Receptor Beta1, Clone: PPG5/10, (1:10 mit PBS verdünnt); AbD Serotec MorphoSys AbD GmbH, Düsseldorf <p><u>Materialien:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Zellkultur Testplatte (24 Wells); TPP AG, Trasadingen, Schweiz ▪ Kamera: AxioCam MRc; Carl Zeiss AG, Oberkochen
Massenspektrometrie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Finnigan MAT 900; Finnigan MAT, Bremen

4. Ergebnisse

4.1. Testverfahren

In keinem der drei Testverfahren zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Absorptionswerten der Negativkontrolle 1 und 2 einer Wellplatte. Daraus ergibt sich, dass die Beimengung von max. 1 % EtOH keine Effekte auf das Wachstum der Zellen ausübte und die Ergebnisse der in EtOH gelösten Substanzen somit nicht verfälscht wurden.

Die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse der Testverfahren beziehen sich, wie oben beschrieben (siehe 3.4.2-3.4.4.), prozentual auf ihre jeweilige Kontrolle. Die Werte der jeweiligen Bezugskontrolle sind im Einzelnen nicht in den Diagrammen angezeigt.

Im Folgenden werden alle signifikanten Auswirkungen der Testsubstanzen auf die Zellen beschrieben. Dabei wurden die Prozentzahlen, um eine bessere Übersicht zu behalten, auf ganze Zahlen auf- bzw. abgerundet. Nicht genannte Testsubstanzen zeigten keine Wirkungen.

4.1.1. LDH-Zytotoxizitätstests

4.1.1.1. MCF-7

Linum usitatissimum-Wurzelextrakt

Bei MCF-7 verursachte das Wurzelextrakt eine signifikante Zellletalität von jeweils ca. 80 % in seinen beiden höchsten Konzentrationen von 500 und 1000 µg/ml. Bei 50 und 100 µg/ml waren die zytotoxischen Effekte mit 4 % bzw. 19 % zwar deutlich niedriger, aber dennoch signifikant (**Abb. 20**).

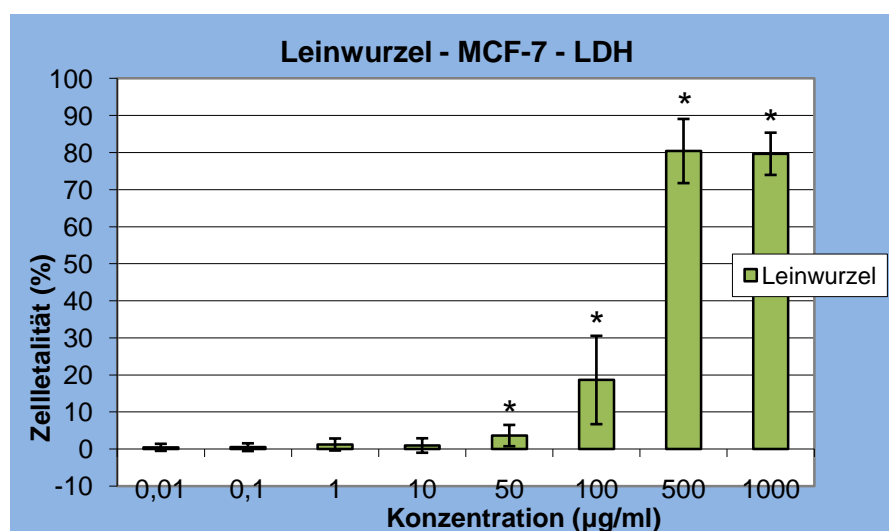


Abb. 20: Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 (LDH-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Triton-Kontrolle (\rightarrow 100 % Zelldestruktion) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5$ %) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Phytoestrogene

Unter den Phytoestrogenen zeigte v.a. Genistein mit rund 32 % Zellletalität bei 50 µg/ml einen signifikanten zytotoxischen Effekt auf MCF-7. Daidzein verursachte nur leichte, aber dennoch signifikante zytotoxische Effekte um jeweils 3 % bei 10 und 50 µg/ml. Ebenso verhielt sich Secoisolariciresinol mit einer geringen, aber signifikanten Zellletalität von 1 % bei 5 µg/ml und 5 % bei 50 µg/ml (Abb. 21).

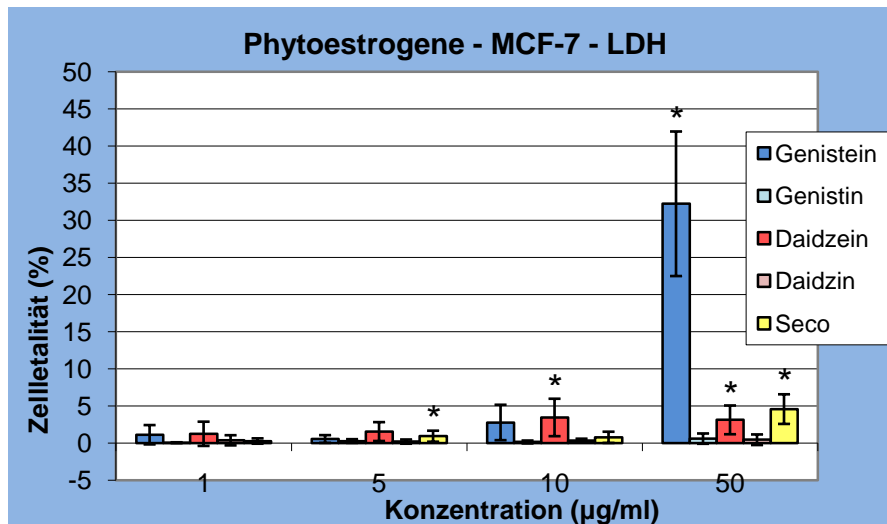


Abb. 21: Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen der Phytoestrogene auf MCF-7 (LDH-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Triton-Kontrolle (\rightarrow 100 % Zelldestruktion) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Kontrollsubstanzen

Tamoxifen zeigte in seinen Konzentrationen von 5, 10 und 50 µg/ml hohe signifikante Zytotoxizitäten auf MCF-7 mit entsprechend 67 %, 76 % und 82 % Zellletalität (Abb. 22).

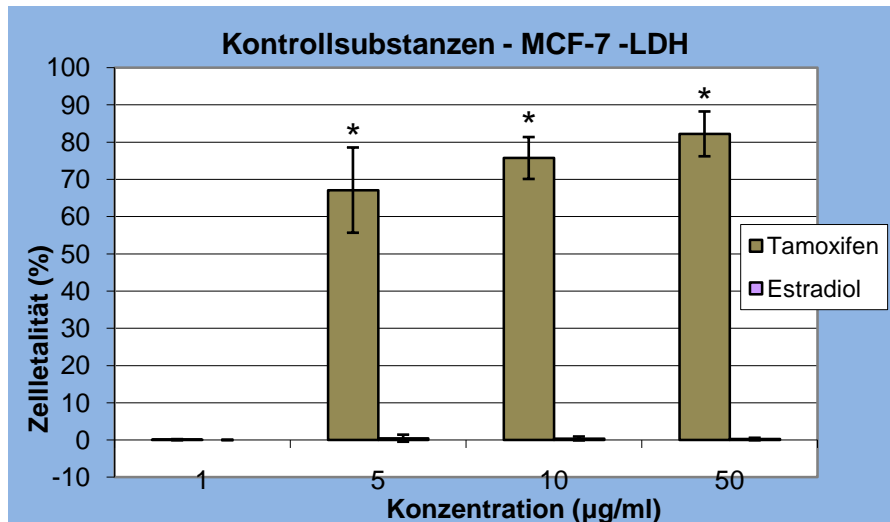


Abb. 22: Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen der Kontrollsubstanzen auf MCF-7 (LDH-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Triton-Kontrolle (\rightarrow 100 % Zelldestruktion) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

4.1.1.2. BT20

Linum usitatissimum-Wurzelextrakt

Auf BT20 wirkte das Wurzelextrakt auch zytotoxisch, jedoch erneut nur in den höheren Konzentrationen mit signifikanten Zellletalitäten von 4 % bei 50 µg/ml, 8 % bei 100 µg/ml, 13 % bei 500 µg/ml und 38 % bei 1000 µg/ml (**Abb. 23**).

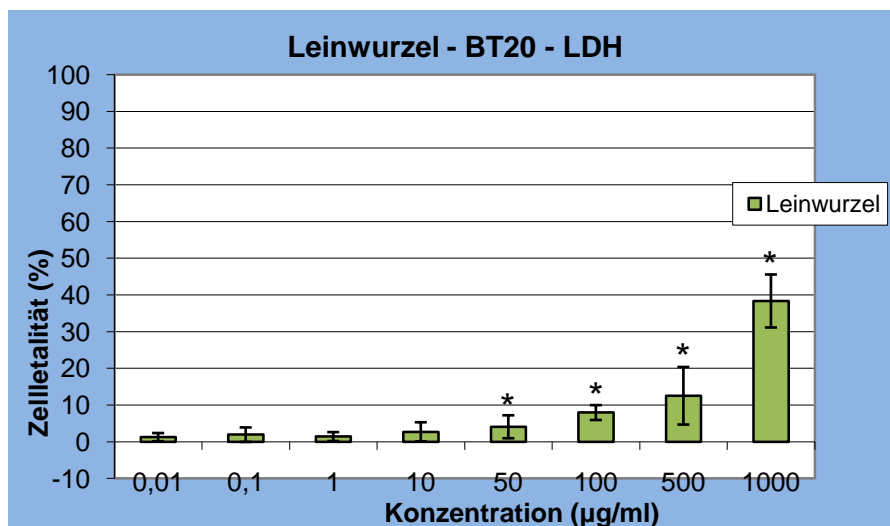


Abb. 23: Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextrakts auf BT20 (LDH-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Triton-Kontrolle (\rightarrow 100 % Zelldestruktion) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Phytoestrogene

Bei der Wirkung der Phytoestrogene auf BT20 gab es, bis auf geringe signifikante zytotoxische Effekte von 1 % bei 1 µg/ml Genistein und 2 % bei 5 µg/ml Secoisolariciresinol, keine Auffälligkeiten bezüglich der Zellletalitäten (**Abb. 24**).

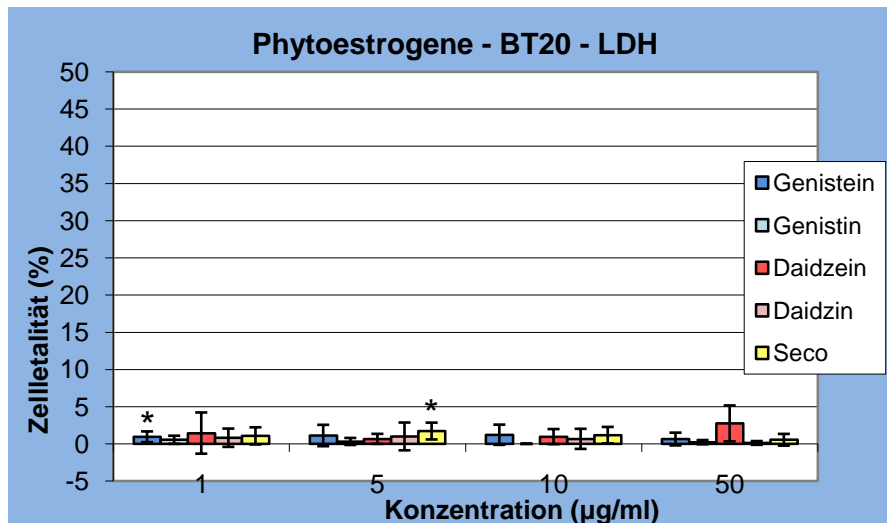


Abb. 24: Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen der Phytoestrogene auf BT20 (LDH-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Triton-Kontrolle (\rightarrow 100 % Zelldestruktion) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Kontrollsubstanzen

Tamoxifen führte auch bei BT20 zu hohen signifikanten Zellletalitäten von 4 % bei 1 µg/ml, 89 % bei 5 µg/ml, 85 % bei 10 µg/ml und 79 % bei 50 µg/ml (**Abb. 25**).

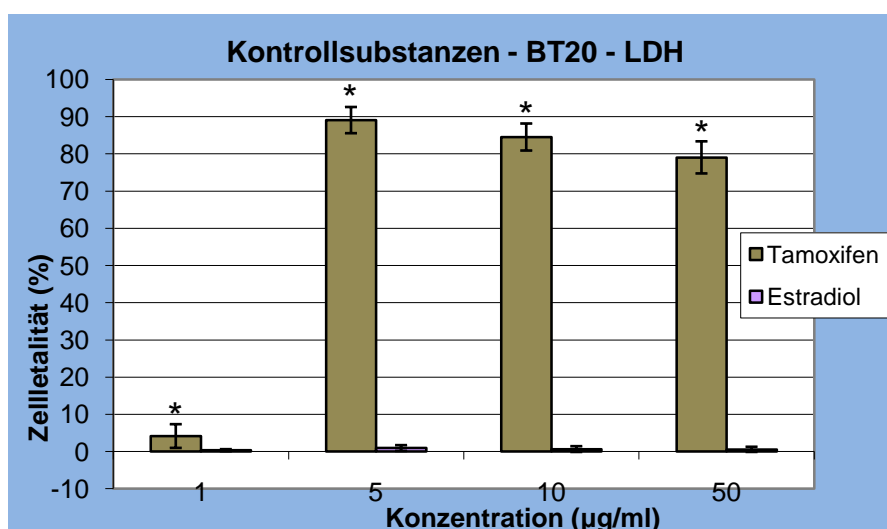


Abb. 25: Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen der Kontrollsubstanzen auf BT20 (LDH-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Triton-Kontrolle (\rightarrow 100 % Zelldestruktion) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

4.1.2. MTT-Zellvitalitäts/-proliferationstests

4.1.2.1. MCF-7

Linum usitatissimum-Wurzelextrakt

Auf MCF-7 zeigte das Wurzelextrakt eine signifikante Hemmung der Zellvitalität von 43 % bei 500 µg/ml und 16 % bei 1000 µg/ml. Dagegen fanden sich bei niedrigeren Konzentrationen von 0,1 bis 100 µg/ml z.T. leicht stimulierende Effekte, wobei die Werte nur bei 10 bzw. 100 µg/ml mit 106 bzw. 110 % signifikant waren (**Abb. 26**).

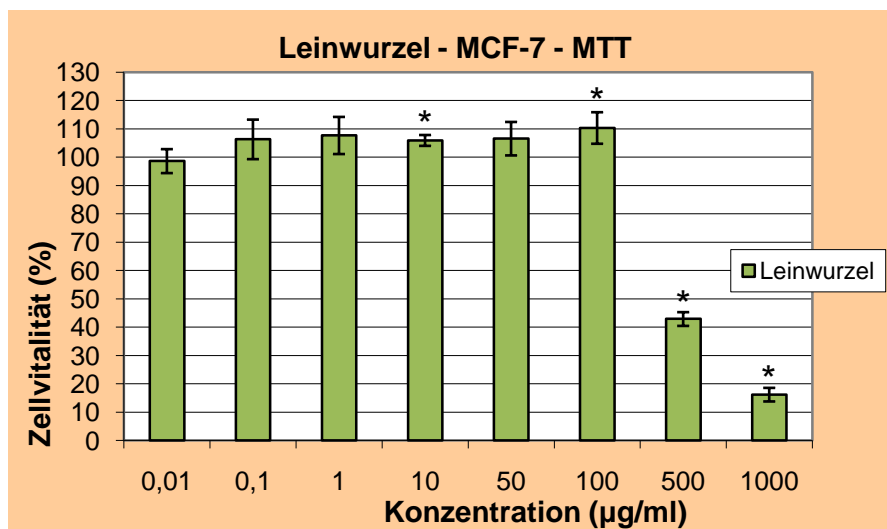


Abb. 26: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 (MTT-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle 2 (\rightarrow 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5$ %) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Phytoestrogene

Aus der Gruppe der Phytoestrogene stimulierte Genistein die Zellvitalität von MCF-7 signifikant mit 122 % bei 5 µg/ml und 118 % bei 10 µg/ml. Bei 50 µg/ml dagegen hemmte Genistein die Zellvitalität auf rund 91 %. Daidzein erzielte einen ähnlichen Effekt mit einer signifikanten Steigerung der Zellvitalität auf 111 % bei 10 µg/ml und einer signifikanten Hemmung derselben auf rund 93 % bei 50 µg/ml (**Abb. 27**).

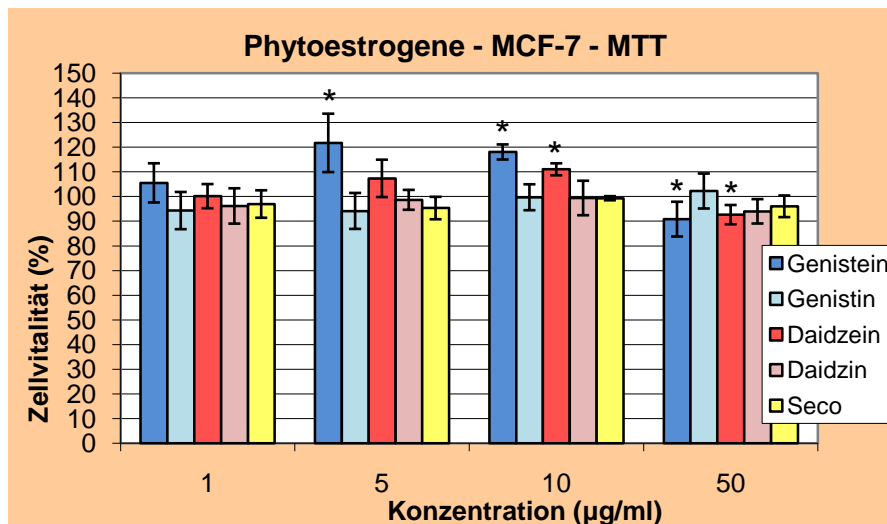


Abb. 27: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Phytoestrogene auf MCF-7 (MTT-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle 2 (\rightarrow 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5$ %) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Kontrollsubstanzen

Tamoxifen zeigte eine signifikante und stufenweise absteigende Hemmung der Zellvitalität von MCF-7 in allen Konzentrationen auf rund 92 % bei 1 µg/ml, 81 % bei 5 µg/ml, 37 % bei 10 µg/ml und ein Maximum von 2 % bei 50 µg/ml. Für 17 β -Estradiol dagegen konnte einerseits eine leichte, aber signifikante Stimulation der Zellvitalität auf rund 104 % bei 10 µg/ml gesehen werden, andererseits wurde diese bei 50 µg/ml signifikant auf rund 74 % gehemmt (Abb. 28).

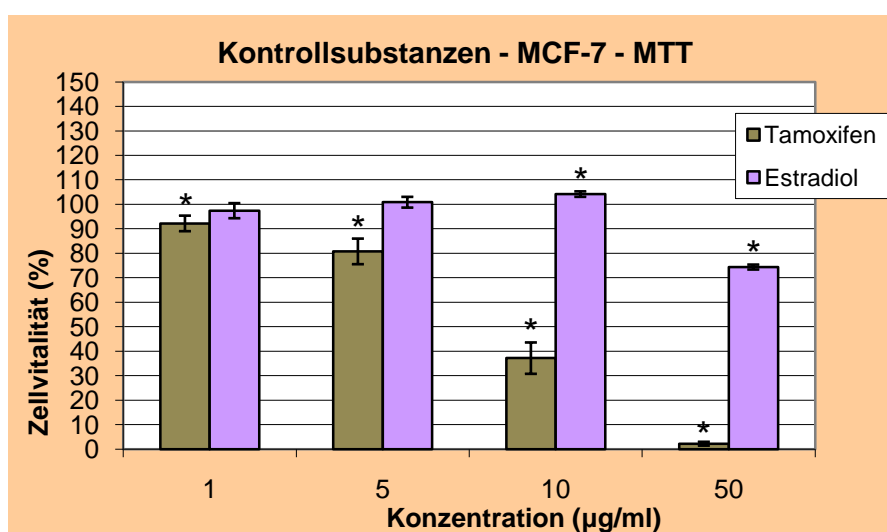


Abb. 28: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Kontrollsubstanzen auf MCF-7 (MTT-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle 2 (\rightarrow 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5$ %) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

4.1.2.2. BT20

Linum usitatissimum-Wurzelextrakt

Auch bei BT20 wirkte das Wurzelextrakt hemmend auf die Zellvitalität. Es zeigten jedoch schon die niedrigen Konzentrationen von 0,01 bis 1 µg/ml einen supprimierenden Effekt, der zwar nur sehr gering, aber mit bis zu 93 % bei 0,01 µg/ml dennoch signifikant ausfiel. Bei 500 und 1000 µg/ml waren die Wirkungen mit einer Reduktion der Zellvitalität auf 27 % und 26 % sehr viel deutlicher (**Abb. 29**).

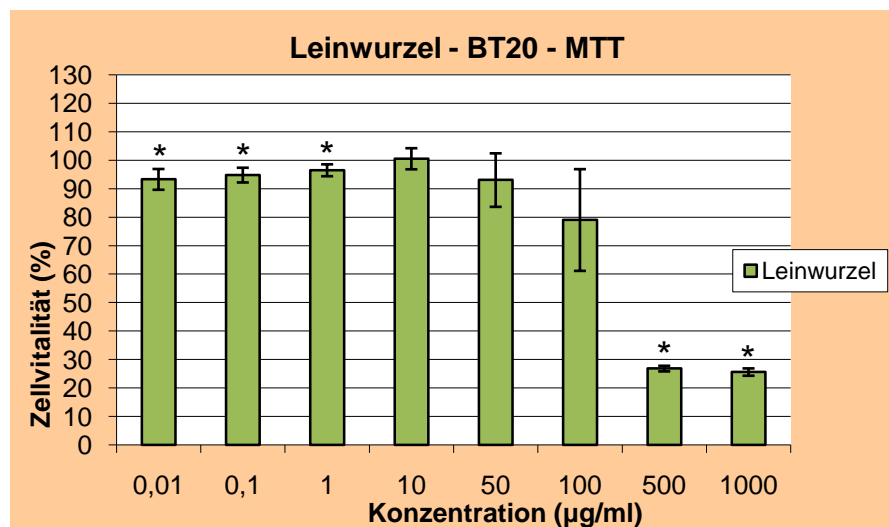


Abb. 29: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextrakts auf BT20 (MTT-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle 2 (\rightarrow 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5$ %) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Phytoestrogene

Genistein verursachte eine leichte, aber signifikante Stimulation der Zellvitalität von BT20 auf 112 % bei 5 µg/ml, jedoch deutlicher eine signifikante Hemmung der Zellen auf rund 56 % bei 50 µg/ml. Desweiteren zeigte auch das Glykosid Genistin Effekte, und zwar stimulierte es die Zellen signifikant auf rund 115 % bei 10 µg/ml und rund 129 % bei 50 µg/ml. Daidzein zeigte leichte, aber dennoch signifikante hemmende Effekte mit rund 94 % bei 10 µg/ml und rund 90 % bei 50 µg/ml. Ähnlich wirkte sein Glykosid Daidzin mit einer diskreten, aber signifikanten Hemmung von rund 93 % bei 1 µg/ml, rund 94 % bei 5 µg/ml und rund 95 % bei 10 µg/ml. Secoisolariciresinol hemmte die Zellen ebenfalls nur leicht, aber signifikant auf rund 93 % bei 1 µg/ml und rund 95 % bei 5 µg/ml (**Abb. 30**).

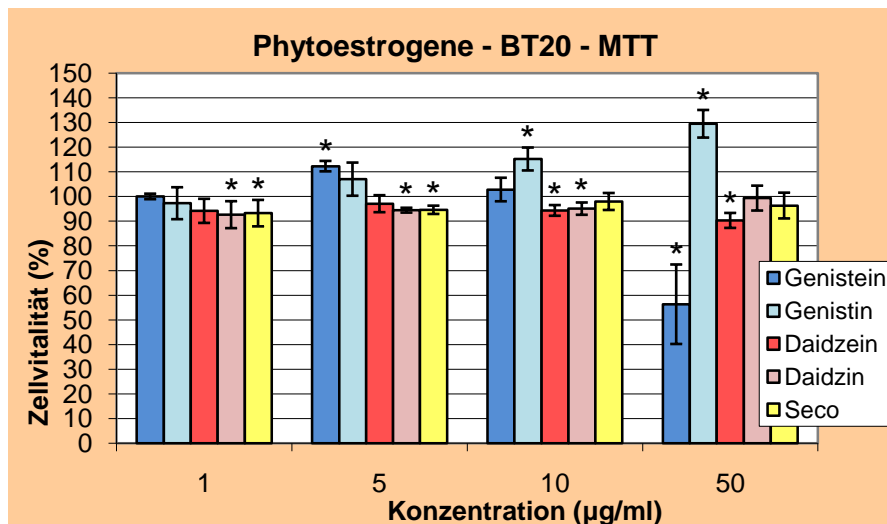


Abb. 30: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Phytoestrogene auf BT20 (MTT-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle 2 (\rightarrow 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Kontrollsubstanzen

Tamoxifen reduzierte die Vitalität der BT20 Zellen signifikant und in allen Konzentrationen stufenweise ansteigend, auf rund 89 % bei 1 µg/ml, 59 % bei 5 µg/ml, 9 % bei 10 µg/ml und maximal mit beinahe 0 % bei 50 µg/ml. 17 β -Estradiol dagegen stimulierte die Zellvitalität bei 5 µg/ml auf rund 129 %. Dagegen hemmte es die Zellen in den höheren Konzentrationen signifikant auf 87 % bei 10 µg/ml und 68 % bei 50 µg/ml (**Abb. 31**).

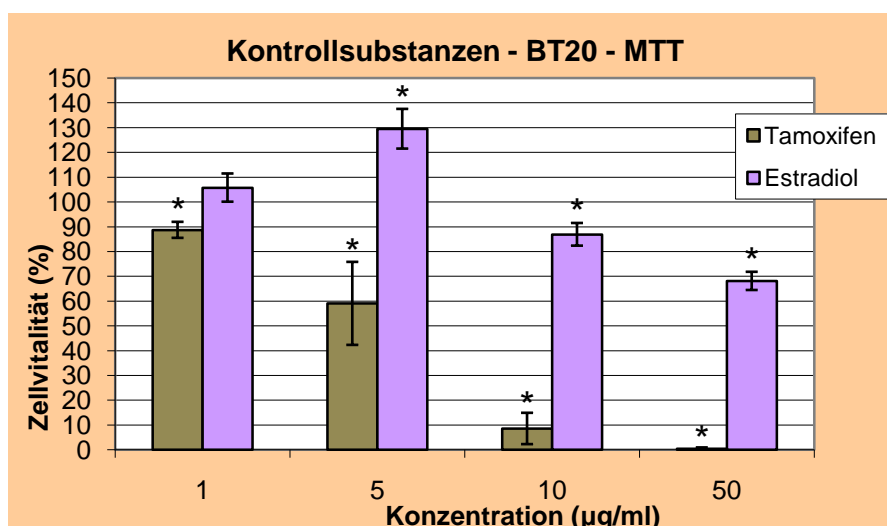


Abb. 31: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Kontrollsubstanzen auf BT20 (MTT-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle 2 (\rightarrow 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

4.1.3. BrdU-Zellproliferationstests

4.1.3.1. MCF-7

Linum usitatissimum-Wurzelextrakt

Auf die Zellproliferation von MCF-7 wirkte das Wurzelextrakt signifikant und progredient hemmend, beginnend mit 72 % bei 50 µg/ml, 45 % bei 100 µg/ml, 10 % bei 500 µg/ml und dem größten Effekt von 8 % bei 1000 µg/ml (**Abb. 32**).

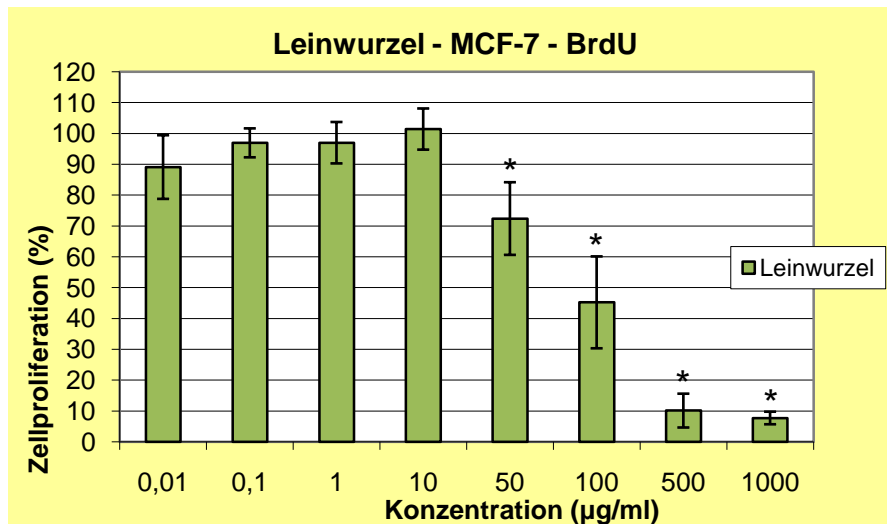


Abb. 32: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 (BrdU-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle 2 (\rightarrow 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Phytoestrogene

Bei den Phytoestrogenen verursachte Genistein eine signifikante Hemmung der Zellproliferation von MCF-7 in allen Konzentrationen stufenweise zunehmend, beginnend mit 90 % bei 1 µg/ml, 89 % bei 5 µg/ml, 82 % bei 10 µg/ml und dem Maximum von 59 % bei 50 µg/ml. Genistin wirkte ähnlich, zwar weniger intensiv, aber dennoch signifikant mit einer Hemmung auf rund 91 % bei 5 µg/ml und 89 % bei 10 µg/ml. Desweiteren hemmte Daidzein die Zellproliferation signifikant auf rund 89 % bei 10 µg/ml und 85 % bei 50 µg/ml. Secoisolariciresinol zeigte eine Reduktion der Proliferation auf 76 % bei 10 µg/ml und 68 % bei 50 µg/ml (**Abb. 33**).

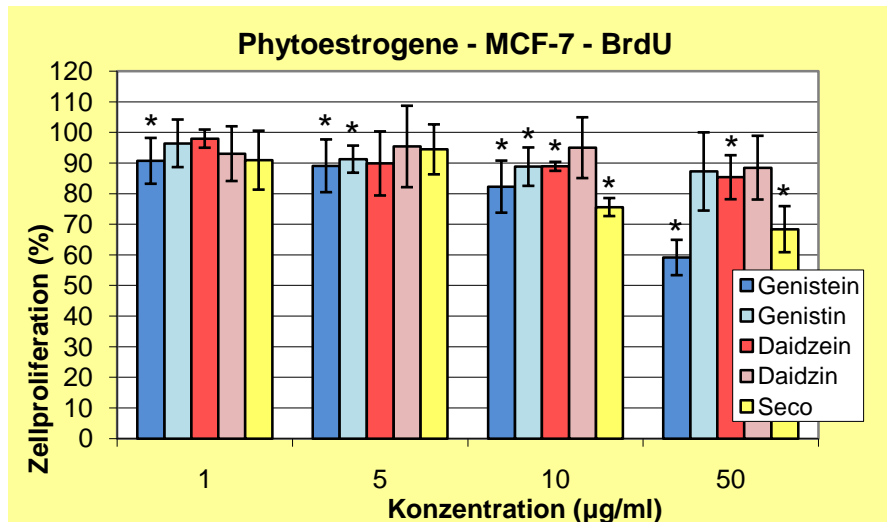


Abb. 33: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Phytoestrogene auf MCF-7 (BrdU-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle 2 (\rightarrow 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Kontrollsubstanzen

Tamoxifen hemmte die Zellproliferation von MCF-7 signifikant auf rund 65 % bei 10 µg/ml und 5 % bei 50 µg/ml. 17 β -Estradiol führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation in allen Konzentrationen, auf 83 % bei 1 µg/ml, 84 % bei 5 µg/ml, 87 % bei 10 µg/ml und 63 % bei 50 µg/ml (**Abb. 34**).

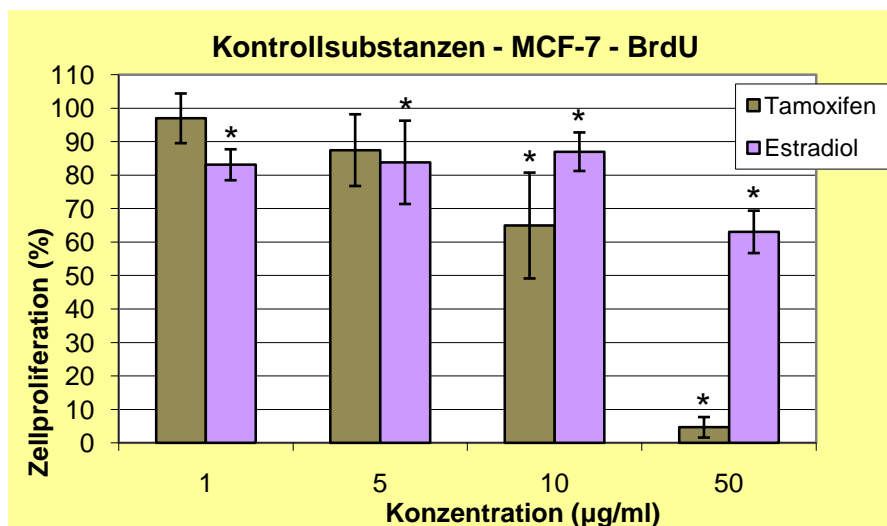


Abb. 34: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Kontrollsubstanzen auf MCF-7 (BrdU-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle 2 (\rightarrow 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

4.1.3.2. BT20

Linum usitatissimum-Wurzelextrakt

Auf BT20 zeigte das Wurzelextrakt eine signifikante stufenweise Hemmung der Zellproliferation, beginnend mit 80 % bei 50 µg/ml, 66 % bei 100 µg/ml, 33 % bei 500 µg/ml und dem größten Effekt bei 1000 µg/ml mit rund 15 % (**Abb. 35**).

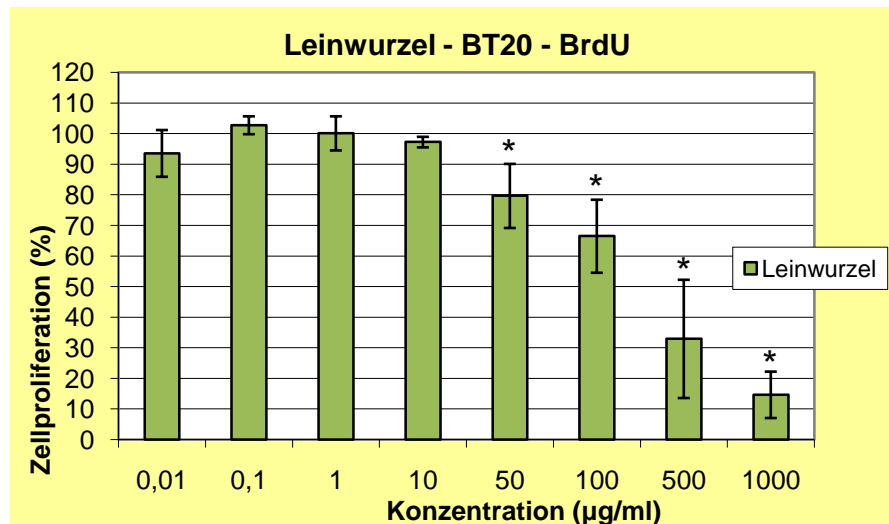


Abb. 35: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextrakts auf BT20 (BrdU-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle 2 (\rightarrow 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5$ %) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Phytoestrogene

Genistein verursachte eine signifikante Hemmung der BT20-Zellproliferation auf rund 72 % bei 10 µg/ml und 50 % bei 50 µg/ml. Genistin dagegen zeigte nur bei 10 µg/ml eine leichte signifikante Hemmung auf 89 %. Daidzein verursachte eine leichte, aber signifikante Hemmung von 92 % bei 10 µg/ml und 90 % bei 50 µg/ml. Secoisolariciresinol verringerte die Zellproliferation signifikant in allen Konzentrationen, auf 90 % bei 1 µg/ml, 91 % bei 5 µg/ml, 93 % bei 10 µg/ml und 73 % bei 50 µg/ml (**Abb. 36**).

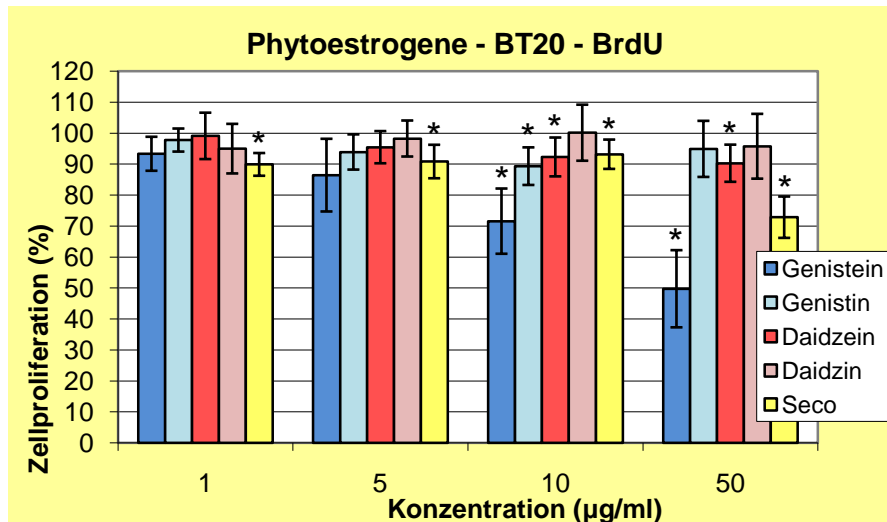


Abb. 36: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Phytoestrogene auf BT20 (BrdU-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle 2 (\rightarrow 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Kontrollsubstanzen

Tamoxifen verursachte eine signifikante Inhibition der Proliferation von BT20 in allen Konzentrationen, auf 87 % bei 1 µg/ml, 41 % bei 5 µg/ml, 3 % bei 10 µg/ml und maximal auf 0 % bei 50 µg/ml. 17 β -Estradiol hemmte ebenfalls die Zellproliferation, jedoch schwächer als Tamoxifen auf jeweils rund 86 % bei 5 und 10 µg/ml sowie auf 76 % bei 50 µg/ml (**Abb. 37**).

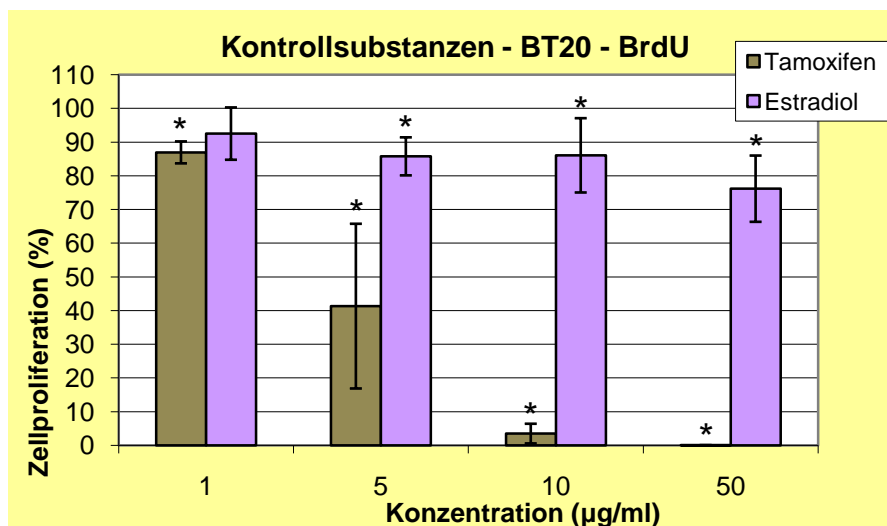


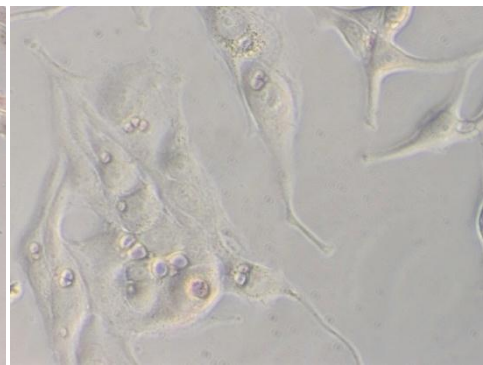
Abb. 37: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Kontrollsubstanzen auf BT20 (BrdU-Test); Mittelwerte \pm Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle 2 (\rightarrow 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

4.2. Immunhistochemie

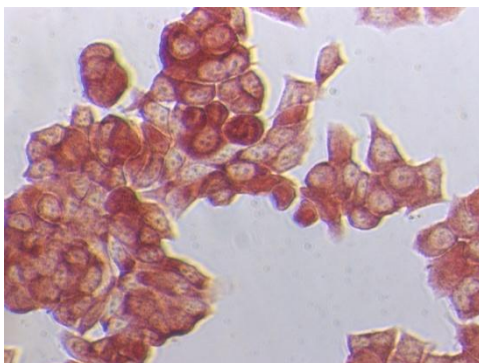
Die immunhistochemische Bestimmung der Hormonrezeptoren ist eine wichtige Grundlage für die Interpretation der vorherigen Ergebnisse. In unseren Untersuchungen zeigte sich zwischen den beiden Zelllinien eine deutlich unterschiedliche Expression der untersuchten Hormonrezeptoren. Betrachtet man MCF-7, waren die Zellmembranen der Zellen bei allen drei getesteten Rezeptortypen rot angefärbt. Jedoch fanden sich zwischen den verschiedenen Rezeptortypen Unterschiede bezüglich der Farbtintensitäten: $ER\alpha > ER\beta > PR$. Bei BT20 dagegen fand sich bei keiner der Rezeptortypen eine kolometrische Reaktion der Zellmembranen. Es konnte jedoch eine leichte Anfärbung der Zellvakuolen gesehen werden. Die Negativkontrollen waren bei beiden Zelllinien stets farblos, sodass von einer korrekten Handhabung des immunhistochemischen Verfahrens ausgegangen werden kann. Die entsprechenden Bilder wurden schließlich mit 32-facher Vergrößerung aufgenommen (**Abb. 38**).



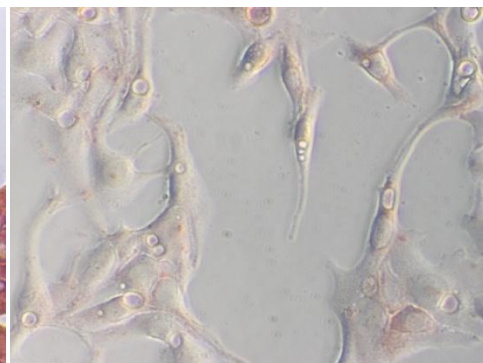
MCF-7: Negativkontrolle



BT20: Negativkontrolle



MCF-7: ER α positiv (+++)



BT20: ER α negativ (-)

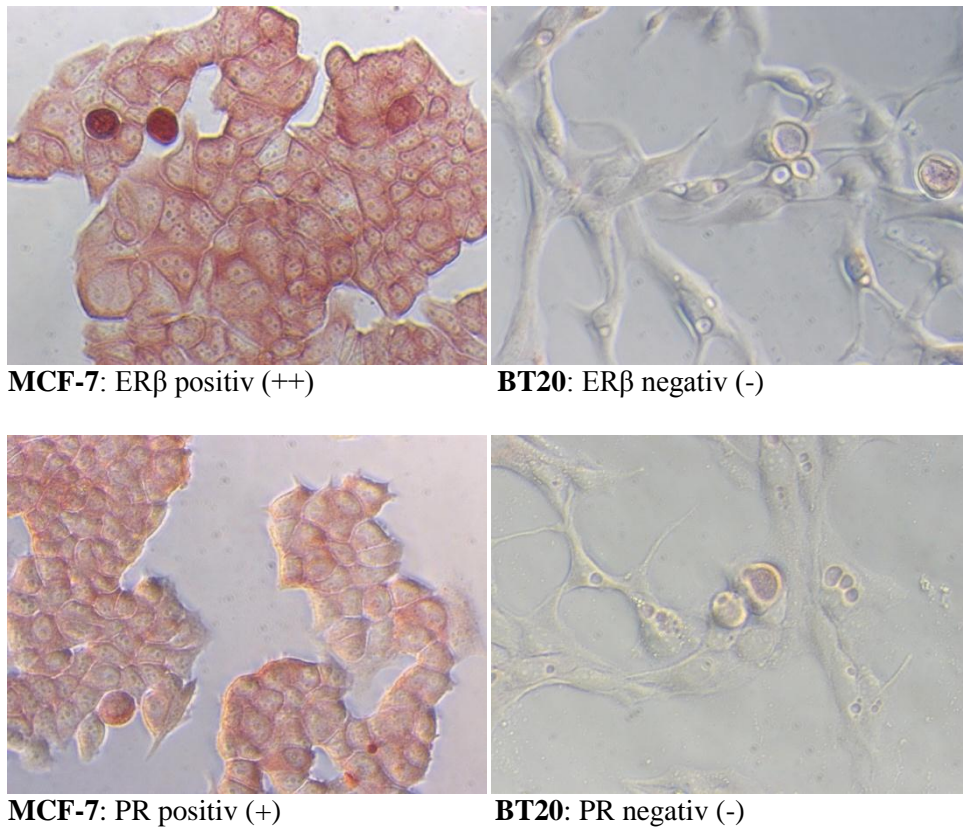


Abb. 38: Mikroskopischer Nachweis der immunhistochemischen Färbungen der ER α/β - bzw. PR-Expression bei MCF-7 (*links*) und BT20 (*rechts*) *in vitro* (32-fache Vergrößerung)

4.3. Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie

Gemäß der oben beschriebenen Signalzuteilung entsprechend 14 verschiedener Stoffklassen (siehe 3.6.), ergab sich folgende Zusammensetzung des in dieser Arbeit hergestellten *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakts in absteigender Reihenfolge (**Abb. 39**): Sterole und Triterpene (21,4 %), freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (n-C₁₆ bis n-C₃₄) (17,8 %), Lignindimere (12,2 %), Lipide (7,7 %) sowie Phenole und Lignan/Lignan-Monomere (4,2 %). Der Anteil aller anderen Stoffklassen betrug unter 3 % der totalen Ionen Intensität (TII). Die Menge der Flavonoide (2,4 %), zu denen auch die Isoflavone zählen, und Lignane (1,9 %) fiel überraschend gering aus.

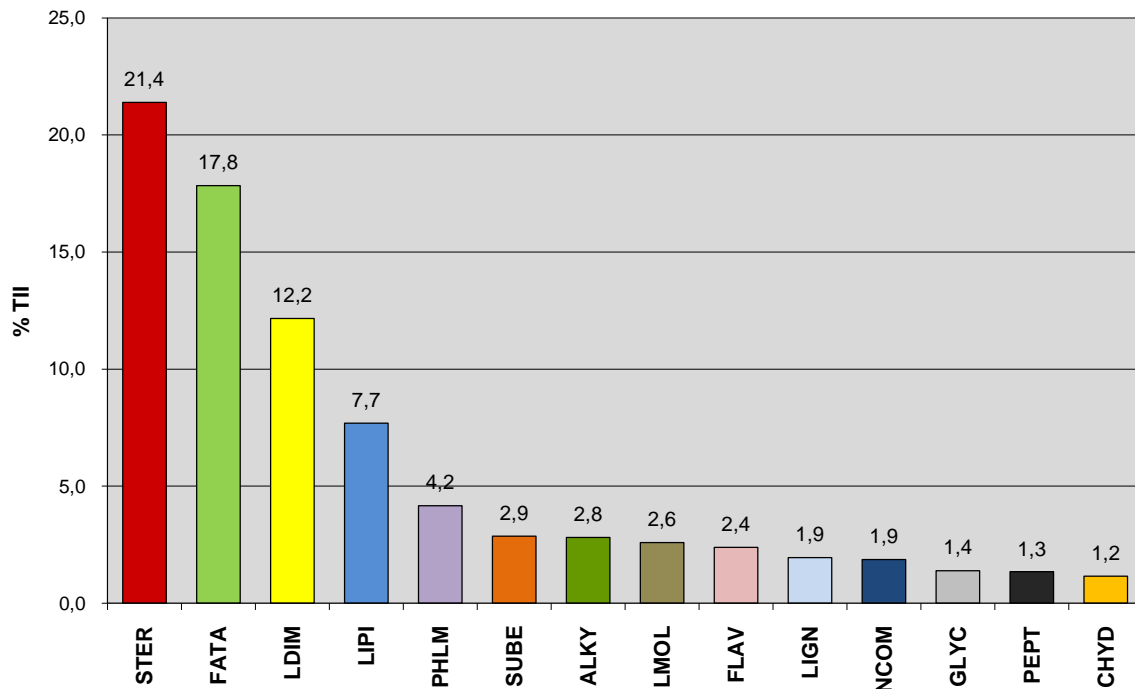


Abb. 39: Zusammensetzung des Leinwurzelextrakts (organische Bestandteile) in % der TII: STER = Sterole und Triterpene, FATA = freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (n-C₁₆ bis n-C₃₄), LDIM = Lignindimere, LIPI = Lipide, Alkane, Alkene, Fettsäuren, n-Alkylester, PHLM = Phenole und Lignin/Lignanmonomere, SUBE = Suberine, ALKY = Alkylaromate, LOWM = niedermolekulare Massensignale (m/z 15...56), FLAV = Flavonoide, LIGN = Lignane, NCOM = Stickstoff-haltige Verbindungen, GLYC = Di- und Triglyceride, PEPT = Peptide und Aminosäuren, CHYD = Kohlenhydrate

5. Diskussion

5.1. Relevante Wirkungen - Vergleich zwischen den Zelllinien

Was den Einfluss des Wurzelextrakts, der Phytoestrogene sowie der Kontrollsubstanzen auf die Zellen betrifft, erachten wir im Zusammenhang mit früheren Experimenten unserer Arbeitsgemeinschaft nur Ergebnisse von mindestens $\pm 30\%$ gegenüber der jeweiligen Kontrolle als relevant, obwohl sich auch schon deutlich niedrigere Werte als signifikant erweisen. Effekte von weniger als 30% können unserer Meinung nach zwar bestimmte Wirk Tendenzen anzeigen, sind aber nicht aussagekräftig genug, um von einer „Wirkung“ zu sprechen. Im Folgenden werden deshalb hauptsächlich die Ergebnisse mit jeweils über 30% Abweichung zur Kontrolle diskutiert.

Mit den LDH-Tests wurde in dieser Arbeit die Zytotoxizität der verwendeten Testsubstanzen untersucht, deren Auswirkung sich in der Letalität der Zellen widerspiegelt. Die MTT-Tests wurden als Verfahren zur Messung der Mitochondrien-Aktivität der Zellen genutzt. Somit können Aussagen über die Vitalität der untersuchten Karzinomzellen gemacht werden. Mit Hilfe der BrdU-Tests kann die Menge an wachstumsaktiven, sich vermehrenden Zellen bestimmt werden. Somit können sowohl der MTT- als auch der BrdU-Test zur Beurteilung des Proliferationsverhaltens der Zellkulturen herangezogen werden.

5.1.1. *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakt

Grundsätzlich lässt sich in allen drei Testmethoden ein zytotoxischer/inhibitorischer Effekt des Wurzelextrakts sowohl auf MCF-7 als auch auf BT20 in den hohen Konzentrationen feststellen, wobei nicht beide Zelllinien gleichmässig betroffen sind. In den MTT-Tests beginnt die Wirkung ab einer Konzentration zwischen 100 und $500\text{ }\mu\text{g/ml}$. Bei den BrdU-Tests sind relevante Wirkungen schon früher ab ca. $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ zu erkennen. Große Unterschiede sind in den LDH-Tests zu beobachten. Grundsätzlich steigt die Wirkstärke des Extrakts in allen drei Testmethoden mit Erhöhung der Konzentration an. In den niedrigeren Konzentrationen lassen sich dagegen keine relevanten Effekte auf die Zellen nachweisen.

Vergleicht man die Wirkungen des Extrakts auf MCF-7 und BT20 in den LDH-Tests, so sieht man deutlich unterschiedliche Wirkstärken in Abhängigkeit von der Zelllinie. So kann bei 500 und $1000\text{ }\mu\text{g/ml}$ eine sehr viel stärkere Wirkung des Extrakts auf MCF-7 als auf BT20 beobachtet werden, mit der größten Differenz von bis zu 67% bei $500\text{ }\mu\text{g/ml}$. Bei BT20 wirkt das Extrakt nur bei $1000\text{ }\mu\text{g/ml}$ deutlich und mit 38% eher schwach (**Abb. 40**).

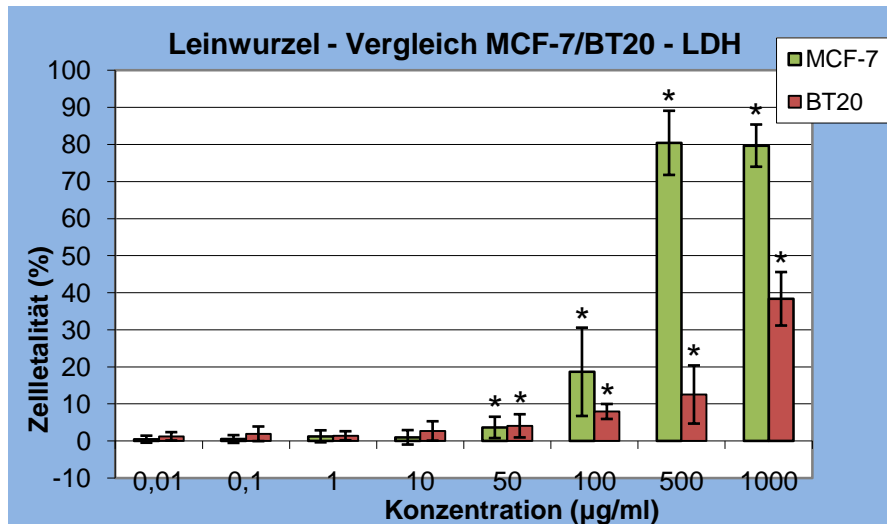


Abb. 40: Vergleichsdarstellung der Wirkungen des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 und BT20 in den LDH-Tests

In den MTT-Tests kann zwar ebenfalls eine zytotoxische Wirkung der hohen Extrakt-Konzentrationen auf beide Zelllinien festgestellt werden, jedoch finden sich hier keine wesentlichen Unterschiede zwischen MCF-7 und BT20. Dagegen sind bei einem Vergleich der Ergebnisse der BrdU-Tests erneut deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien zu verzeichnen, wobei das Wurzelextrakt - wie schon in den LDH-Tests - stärker auf MCF-7 als auf BT20 wirkt. Zwar sind die Differenzen kleiner als in den LDH-Tests, aber dennoch in allen hohen Konzentrationen mit Unterschieden von bis zu 23 % Differenz bei 500 µg/ml gut zu erkennen (**Abb. 41**).

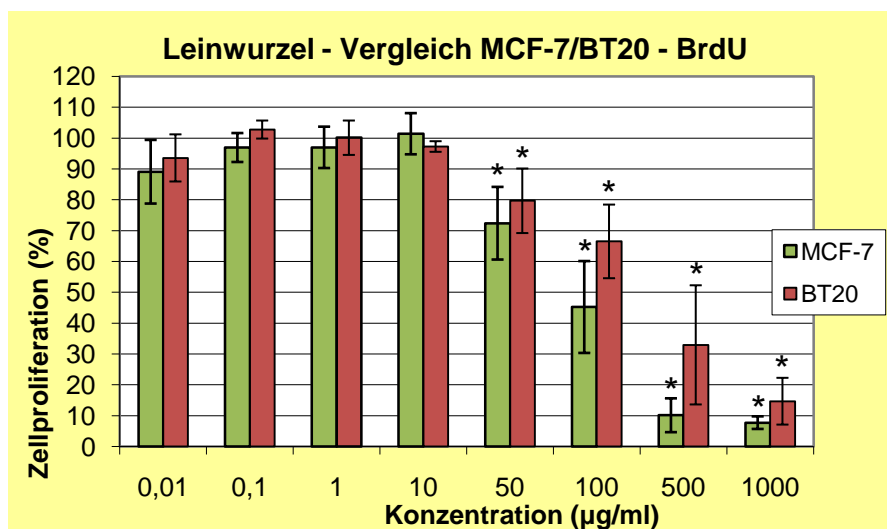


Abb. 41: Vergleichsdarstellung der Wirkungen des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 und BT20 in den BrdU-Tests

5.1.2. Phytoestrogene

Bei den Wirkungen der Phytoestrogene zeigt Genistein die deutlichsten Ergebnisse. In seiner höchsten Konzentration wirkt es in allen drei Testverfahren, z.T. auf beide Zelllinien, zytotoxisch/hemmend. Dagegen wirkt sein Glykosid Genistin in der höchsten Konzentration im MTT-Test stimulierend auf BT20. In den niedrigeren Konzentrationen von Genistein sieht man zum Teil milde stimulierende Wirkungen im MTT-Test. Desweiteren hemmt Secoisolariciresinol in seiner höchsten Konzentration die Zellproliferation beider Zelllinien im BrdU-Test.

Vergleicht man die Wirkungen von Genistein zwischen den beiden Zelllinien in den LDH-Tests, zeigt sich nur bei MCF-7 eine relevante Zytotoxizität von rund 32 % Zellletalität bei 50 µg/ml, während bei BT20 keinerlei Zellletalität zu sehen ist (**Abb. 42**).

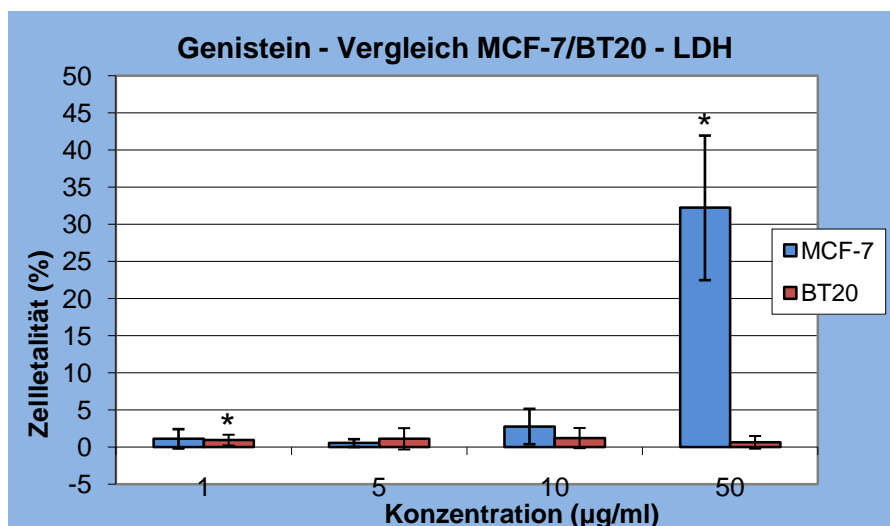


Abb. 42: Vergleichsdarstellung der Wirkungen von Genistein auf MCF-7 und BT20 in den LDH-Tests

In den MTT-Tests scheint Genistein in den Konzentrationen von 5 und 10 µg/ml leicht stimulierend auf die Vitalität von MCF-7 zu wirken, jedoch mit geringen Werten von deutlich unter 130 %. Diese Wirkung ist bei BT20 nicht zu sehen, mit Ausnahme einer schwachen Erhöhung der Vitalität bei 5 µg/ml. Dagegen hemmt Genistein die Zellvitalität von BT20 bei 50 µg/ml deutlich, die von MCF-7 jedoch kaum (**Abb. 43**).

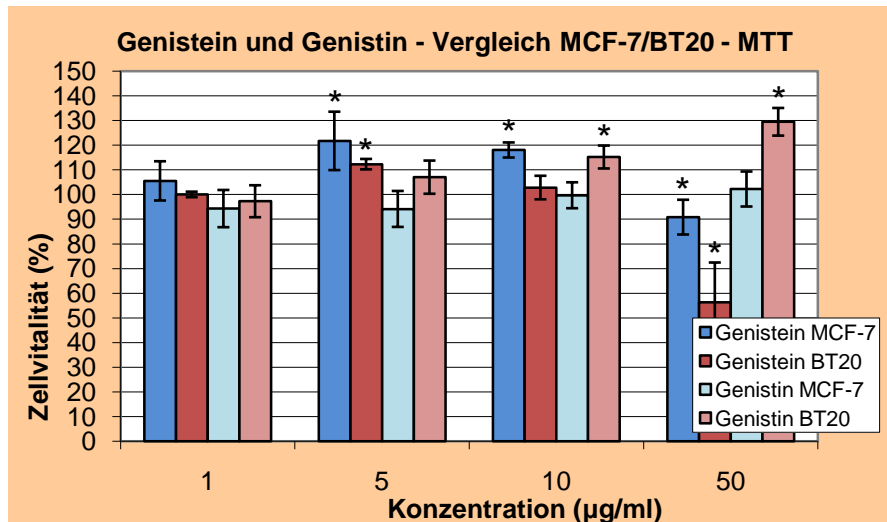


Abb. 43: Vergleichsdarstellung der Wirkungen von Genistein und Genistin auf MCF-7 und BT20 in den MTT-Tests

In den BrdU-Tests übt Genistein sowohl bei 10 als auch bei 50 µg/ml einen tendenziell stärkeren Einfluss auf BT20 aus als auf MCF-7, wobei die Unterschiede mit knapp 10 % Differenz relativ gering sind. Die Wirkungen von Secoisolariciresinol bei 50 µg/ml sind mit einer Proliferationshemmung auf rund 70 % bei beiden Zelllinien ähnlich (**Abb. 44**).

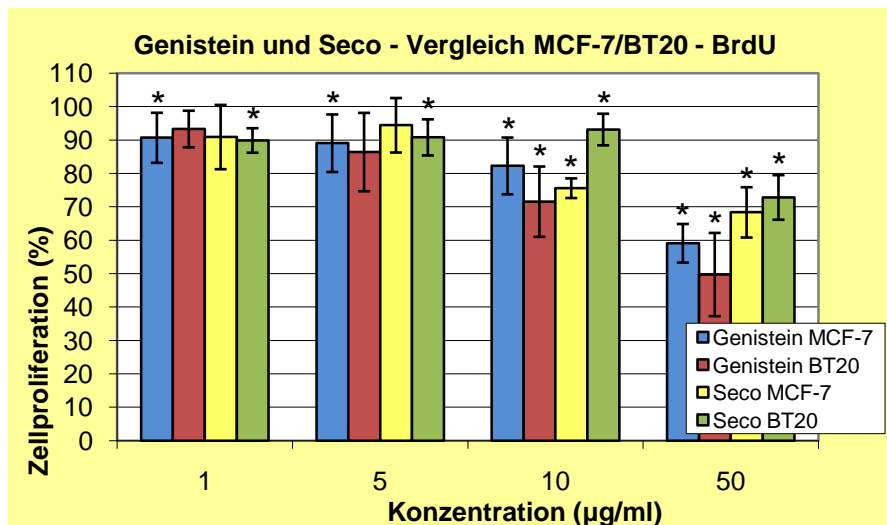


Abb. 44: Vergleichsdarstellung der Wirkungen von Genistein und Secoisolariciresinol auf MCF-7 und BT20 in den BrdU-Tests

5.1.3. Kontrollsubstanzen

Tamoxifen führt schon ab ca. 5 µg/ml aufwärts zu einer starken Zytotoxizität/Hemmung in allen drei Testverfahren, wobei auch hier z.T. Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien erkennbar sind. Die Wirkungen des Estradiols sind dagegen überschaubar. Einmalig zeigt es einen proliferationsstimulierenden Effekt auf BT20 im MTT-Test. Daneben wirkt es z.T.

hemmend in seiner höchsten Konzentration, jedoch nicht immer auf beide Zelllinien und konstant in allen Testmethoden.

Vergleicht man die Wirkungen zwischen beiden Zelllinien, lässt sich der zytotoxische Effekt von Tamoxifen in den LDH-Tests mit einer durchschnittlichen Zellletalität von rund 80 % bei 5, 10 und 50 µg/ml beziffern. Dabei ist die Wirkung auf beide Zelllinien, bis auf eine Differenz von ca. 22 % bei 5 µg/ml, ähnlich (**Abb. 45**).

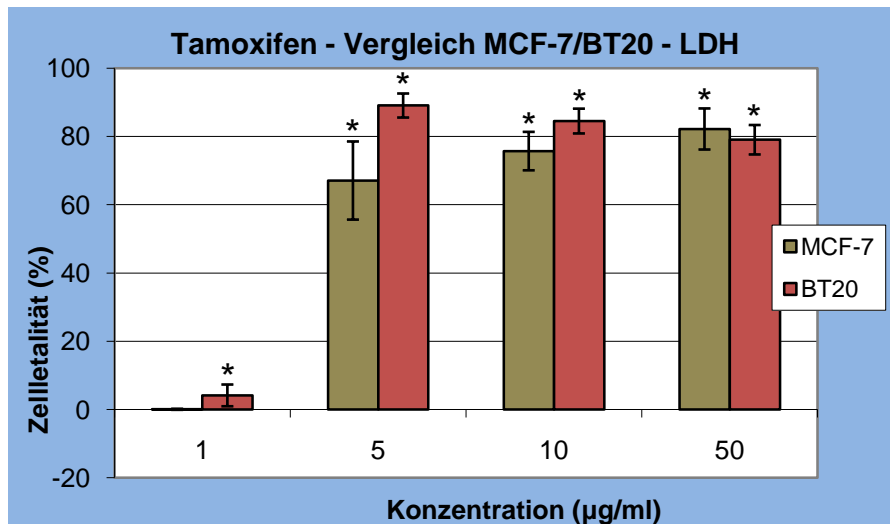


Abb. 45: Vergleichsdarstellung der Wirkungen von Tamoxifen auf MCF-7 und BT20 in den LDH-Tests

In den MTT-Tests hat Tamoxifen auf BT20 einen potenteren Einfluss als auf MCF-7, wobei der maximale Unterschied hier ca. 28 % bei 10 µg/ml beträgt. 17β-Estradiol stimuliert die Proliferation von BT20 bei 5 µg/ml auf fast 130 %, während bei MCF-7 keine Wirkung zu sehen ist. Die hemmende Wirkung des Estradiols in seiner höchsten Konzentration ist auf beide Zelllinien in etwa gleich stark ausgeprägt (**Abb. 46**).

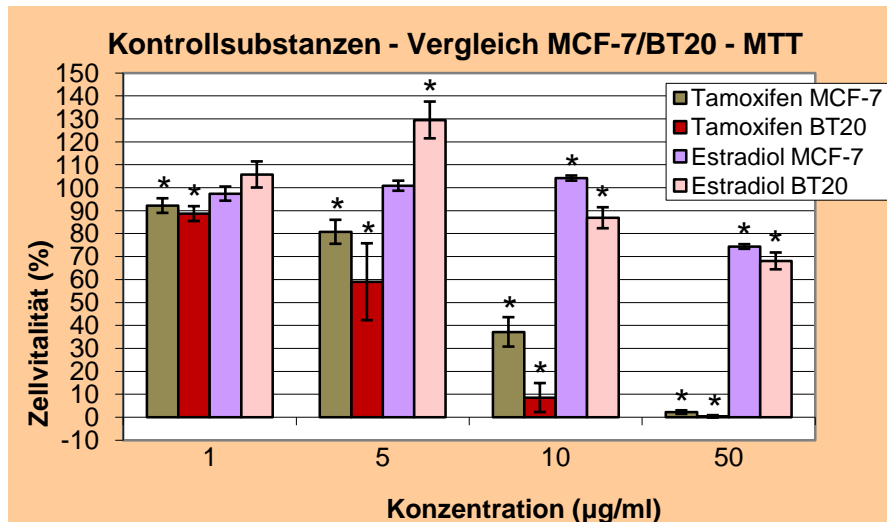


Abb. 46: Vergleichsdarstellung der Wirkungen von Tamoxifen und 17 β -Estradiol auf MCF-7 und BT20 in den MTT-Tests

Betrachtet man die Wirkungen in den BrdU-Tests, wird erneut eine stärkere Wirkung des Tamoxifens auf BT20 mit einer maximalen Differenz von 62 % zu MCF-7 bei 10 µg/ml deutlich. Bei 17 β -Estradiol gibt es zwischen den Zelllinien, außer einem leicht stärkeren Effekt auf MCF-7 bei 50 µg/ml (Differenz: 13 %), keine nennenswerten Unterschiede (**Abb. 47**).

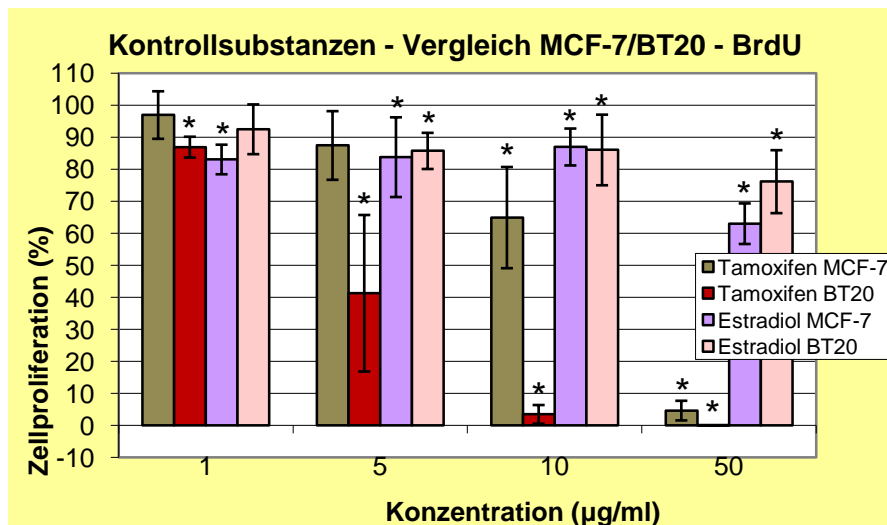


Abb. 47: Vergleichsdarstellung der Wirkungen von Tamoxifen und 17 β -Estradiol auf MCF-7 und BT20 in den BrdU-Tests

5.2. Interpretation der Ergebnisse

5.2.1. Expression der Hormonrezeptoren

Die in den immunhistochemischen Untersuchungen beobachteten Rotfärbungen der Zellmembranen deuten auf eine Anfärbung der jeweiligen auf der Zelloberfläche exprimierten

Hormonrezeptoren hin, was somit das Vorhandensein des jeweiligen Rezeptortyps beweist. So fanden sich bei MCF-7, analog zu den Angaben in der Literatur, positive Nachweise von ER α , ER β und PR [Brooks SC et al., 1973; Brandes LJ et al., 1983]. Im Gegensatz dazu konnten bei BT20 keine der oben genannten Hormonrezeptoren nachgewiesen werden, was ebenfalls mit der Literatur übereinstimmt [Castles CG et al., 1993]. Bezüglich den unterschiedlichen Farbintensitäten zwischen den verschiedenen Rezeptortypen bei MCF-7 lässt sich eine unterschiedlich starke Expression vermuten: ER α (+++) > ER β (++) > PR (+). Die bei der Hormonrezeptor-negativen Zelllinie BT20 erkennbaren leichten Rotfärbungen, die nur im Bereich der Vakuolen auftreten, müssen als Artefakt angesehen werden. Vermutlich drang der Farbstoff in die Vakuolen ein und konnte durch das Spülen nicht ausreichend entfernt werden.

5.2.2. Beteiligung der Hormonrezeptoren an den Wirkungen

In etwa 70 % aller Brustkrebserkrankungen lässt sich eine Expression der ER feststellen, wobei in diesen Fällen v.a. Estrogen für das Tumorstadium verantwortlich gemacht wird [Rice S et al., 2006]. Aber auch PR können auf Brustkrebszellen exprimiert sein. Ihr Einfluss in Zusammenhang mit dem Wachstumsverhalten von Mammakarzinomen ist jedoch bisweilen noch wenig verstanden [Lange CA, 2008]. Im Folgenden wird deshalb nur die Beteiligung der ER diskutiert.

Wie schon oben beschrieben, hatte das *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakt sowohl im LDH- als auch im BrdU-Test eine deutlich potentere antikanzerogene Wirkung auf MCF-7 als auf BT20. Dies suggeriert, dass maßgeblich ER-abhängige Mechanismen am Wirkmechanismus des Extrakts beteiligt sind, wenn man davon ausgeht, dass der ER-Status die Ursache für den Wirkunterschied zwischen den beiden Zelllinien ist. Eine alternative Erklärung könnte auch eine höhere Sensitivität der MCF-7 Zellen gegenüber dem Wurzelextrakt im Vergleich zu BT20 sein. Da auch BT20 als ER-negative Zelllinie, wenn auch nur schwach, auf das Extrakt ansprach, lässt sich schlussfolgern, dass auch andere, ER-unabhängige Mechanismen, an der antikanzerogenen Wirkung beteiligt sein müssen. Entsprechende Literatur, in der das Proliferationsverhalten von Mammakarzinomzellen im Zusammenhang mit Wurzelextrakten aus der Leinpflanze *in vitro* untersucht wurde, gibt es außerhalb unserer Forschungsgruppe bisher nicht. Jedoch zeigten verschiedene *in vivo* Studien an Mäusen, dass diätisch zugeführte Leinsamen das Tumorstadium von sowohl MCF-7 als auch von diversen ER-negativen Mammakarzinom-Zelllinien reduzierten [Chen J et al., 2002 und 2007].

Auch bei den getesteten Phytoestrogenen lassen sich, aufgrund von Wirkunterschieden zwischen MCF-7 und BT20, Vermutungen bezüglich der Beteiligung der ER an den Wirkungen aufstellen. Die Beobachtung, dass Genistein im LDH-Test nur bei MCF-7 zytotoxisch wirkte, lässt die Annahme zu, dass es seine Zytotoxizität über den ER vermittelt. Dagegen verursachte es im MTT-Test nur bei BT20, im BrdU-Test aber bei beiden Zelllinien antiproliferative Effekte, wobei bei letzterem BT20 sogar etwas stärker betroffen war. Diese Ergebnisse zeigen, dass die ER hier vermutlich nicht maßgeblich an den hemmenden Mechanismen des Genisteins auf Zellvitalität und -proliferation beteiligt sind, sondern vielmehr andere ER-unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen. Ähnliches gilt auch für das Lignan Secoisolariciresinol, welches im BrdU-Test ebenfalls auf beide Zelllinien Wirkung zeigte. Dagegen verursachte Genistein in niedrigen Konzentrationen eine milde Stimulation von MCF-7. Da BT20 davon kaum betroffen war, ist hier ein ER-abhängiger Mechanismus bei der Stimulation von MCF-7 anzunehmen. Auch das Glykosid Genistin wirkte im MTT-Test stimulierend, aber auf BT20 und nicht auf MCF-7. Das spricht dafür, dass die Proliferation der BT20 Zellen ebenso stimuliert werden kann, allerdings ER-unabhängig. Eventuell könnte BT20 bezüglich dieses Mechanismus des Genistins auch sensibler sein als MCF-7.

Bei den getesteten Kontrollsubstanzen wirkte Tamoxifen v.a. in den MTT- und BrdU-Tests stärker inhibitorisch auf BT20 als auf MCF-7, was vermuten lässt, dass das Antiöstrogen Tamoxifen ebenfalls v.a. ER-unabhängige Mechanismen benützt, um seine Hemmung auf den Zellstoffwechsel zu vermitteln. Dies überrascht, da für Tamoxifen, als eine Substanz aus der Gruppe der SERMs, eigentlich ein ER-vermittelter Mechanismus angenommen wurde [Oseni *T et al.*, 2008]. 17β -Estradiol stimulierte in niedriger Konzentration die Proliferation von BT20 in den MTT-Tests. Hier lässt sich erneut erkennen, dass sich die ER-negative Zelllinie BT20 wahrscheinlich anderer, ER-unabhängiger Signalmechanismen bedient, durch welche sie zu einer Proliferation angeregt werden kann. Hohe 17β -Estradiol-Konzentrationen dagegen hemmten z.T. die Zellvitalität und -proliferation beider Zelllinien, was erneut für eine ER-unabhängige Signaltransduktion bezüglich der Hemmeffekte spricht.

5.2.3. Wirkungen der Phytoestrogene

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die in der Literatur verbreitete These, dass Genistein konzentrationsabhängig, in niedrigen Konzentrationen stimulierend und in hohen inhibierend, auf MCF-7 Zellen *in vitro* wirkt. Dabei fallen bei Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse v.a. die antiproliferativen Wirkungen des Genisteins auf MCF-7 in der höchsten Konzentration auf. Auch viele andere Studien zeigen diese Effekte auf MCF-7 *in vitro*, wobei

hierbei sehr komplexe, tendenziell ER-unabhängige Mechanismen für die Proliferationshemmung angenommen werden [Chen WF *et al.*, 2003; Shim HY *et al.*, 2007; Leung LK *et al.*, 2000]. Auf der anderen Seite sind in unseren Untersuchungen bei niedrigen Genisteinkonzentrationen auch geringe proliferative Effekte auf MCF-7 gesehen worden. Auch hier gibt es Studien, in denen ähnliche Effekte des Genisteins auf MCF-7 *in vitro* gezeigt wurden, wobei hier vermutlich ER-abhängige Mechanismen verantwortlich sind, indem Genistein als Estrogen-Agonist wirkt und somit eine Genexpression induziert [Hsieh CY *et al.*, 1998; Maggiolini M *et al.*, 2001]. Da diese Effekte in unseren Untersuchungen nur in den MTT-Tests, und dort auch nur sehr schwach, zu sehen waren, gehen wir davon aus, dass die Inkubationszeit der Zellen zu kurz war, sodass eine ER-abhängige Genexpression nicht vollständig ablaufen konnte. Die Tatsache, dass die Ergebnisse nur in den MTT-Tests zu sehen waren, lässt auch für eine mitochondrielle Beteiligung vermuten. Betrachtet man den Einfluss von Genistein auf BT20, sieht man, dass es auch hier in seiner höchsten Konzentration antiproliferativ wirkt. Studien, in denen BT20 Zellen mit Genistein *in vitro* getestet wurden, sind rar, berichten jedoch ebenfalls über eine proliferationshemmende Wirkung in hohen Konzentrationen [Cappelletti V *et al.*, 2000; Peterson G *et al.*, 1996]. Proliferative Wirkungen niedriger Genisteinkonzentrationen auf BT20 konnten in unseren Untersuchungen nicht festgestellt werden, was die These bestätigt, dass die proliferativen Effekte bei MCF-7 wahrscheinlich über die ER vermittelt werden. Die Tatsache, dass Genistein auch bei BT20 anti-proliferative Effekte verursachte, bestätigt die Annahme, dass diese vermutlich durch ER-unabhängige Mechanismen induziert werden, zumindest was die BT20 Zellen betrifft. Eine Beteiligung der ER bezüglich der MCF-7 Zellen ist jedoch möglich [Shao ZM *et al.*, 2000]. In den letzten Jahren wurden zahlreiche *in vitro*-Mechanismen des Genisteins diskutiert. Man geht davon aus, dass es auf sehr unterschiedliche und komplexe Weise auf Gene Einfluss nehmen kann, die in der Regulation der Zellproliferation, Apoptose, Onkogenese, Transkription und Signaltransduktion eine Rolle spielen. Diese Effekte könnten beispielsweise durch spezifische Wirkungen auf Akt, NF- κ B, MMPs und Bax/Bcl-2 Signalwege verursacht werden [Banerjee S, 2008 *et al.*; Sarkar FH *et al.*, 2006].

Entgegengesetzt zu Genistein verhielt sich das entsprechende Glykosid Genistin, welches in seiner höchsten Konzentration, allerdings nur im MTT-Test und was die BT20 Zellen betrifft, eine proliferationsstimulierende Wirkung zeigte. Es wird somit deutlich, dass sich die Wirkungen des Genisteins abhängig vom Status der Glykosylierung unterscheiden können. Inwiefern dies auch auf andere Isoflavone übertragbar ist, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Bisher wurde nur spekuliert, dass sich Genistin, verglichen mit seinem freien Aglykon

Genistein, praktisch inaktiv gegenüber Krebszellen verhält [Polkowski K *et al.*, 2004]. Desweiteren wurden für einige Isoflavon-Glykoside schwache estrogenische Wirkungen *in vitro* beschrieben, allerdings bei niedrigeren Konzentrationen als es hier der Fall war [Zhang Y *et al.*, 1999]. Die Tatsache, dass der stimulierende Effekt von BT20 nur im MTT-Test vorkam, lässt an einen mitochondriellen Wirkmechanismus denken.

Die antiproliferativen Wirkungen des Secoisolariciresinols auf beide Zelllinien korrelieren mit Ergebnissen aus *in vivo*-Studien, in denen diätisch zugeführtes Lariciresinol, ein Derivat des Secoisolariciresinols, antikanzeröse Wirkungen auf MCF-7 Heterotransplantate in Ratten zeigte [Saarinen NM *et al.*, 2008]. Die Tatsache, dass sich die Wirkungen des Secoisolariciresinols nur im BrdU-Test zeigten, weist auf die Transkription beeinflussende Mechanismen, wie z.B. eine Hemmung der DNA-Replikation, hin [Wang C *et al.*, 1997]. Der Mechanismus scheint dabei unabhängig vom ER zu sein, zumindest was BT20 betrifft. Betrachtet man den Metabolismus des Secoisolariciresinols im Menschen (siehe 1.4.4.), sollte man jedoch den Säugerylignanen END und ENL mehr Aufmerksamkeit schenken, da diese nach der Einnahme von Secoisolariciresinol die Hauptmetaboliten in der Zirkulation und wahrscheinlich auch im peripheren Gewebe sind [Kuijsten A *et al.*, 2005]. Dennoch zeigen die vorliegenden Ergebnisse einen antiproliferativen Effekt hoher Secoisolariciresinol-Konzentrationen sowohl auf MCF-7 als auch auf BT20 *in vitro*, was in der Literatur bislang noch nicht beschrieben wurde. Eine proliferationssteigernde Wirkung der Lignane konnte hingegen nicht beobachtet werden.

Daidzein, welches ähnlich wie Genistein dafür bekannt ist, konzentrationsabhängig auf MCF-7 *in vitro* zu wirken [Choi EJ *et al.*, 2008; Sathyamoorthy N *et al.*, 1997], zeigte keine relevanten Wirkungen. Ebenso konnten keine Effekte auf BT20 gesehen werden.

5.2.4. Wirkungen der Kontrollsubstanzen

Was die Effekte von Tamoxifen auf MCF-7 betrifft, ist bekannt, dass Tamoxifen *in vitro* hauptsächlich über eine ER-abhängige Modulation der Gen-Expression eine Arretierung des Zellzyklus und somit eine Hemmung der Zellproliferation sowie außerdem Apoptose initiieren kann [Perry RR *et al.*, 1995; Otto AM *et al.*, 1996; Zheng A *et al.*, 2007]. Wie schon oben (siehe 5.2.1.) erwähnt, zeigte Tamoxifen aber auch zytotoxische und hemmende Wirkungen auf BT20. In verschiedenen Studien konnten diese Hemmeffekte des Tamoxifens ebenfalls auf andere ER-negative Mammakarzinomzellen *in vitro* gezeigt werden [Bardon S *et al.*, 1984; Perry RR *et al.*, 1995; Bachmann-Moisson N *et al.*, 1996]. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch ER-unabhängige, wahrscheinlich nicht-genomische Mechanismen vorhanden sind,

durch welche Tamoxifen seine Wirkung induzieren kann [Zheng A *et al.*, 2007]. Diesbezüglich werden eine Reihe an verschiedenen Mechanismen, z.B. eine Modulation der Calciumsignalwege, Hemmung der Estrogen-abhängigen Protein-Kinase C, Induktion von oxidativem Stress und mitochondrialer Dysfunktion sowie eine Rolle des EGFR und TGF β diskutiert [Zhang W *et al.*, 2000; Boyan BD *et al.*, 2003; Gundimeda U *et al.*, 1996; Zheng A *et al.*, 2007; Perry RR *et al.*, 1995].

Hinsichtlich der Wirkungen des Estradiols gilt, dass es - ähnlich wie Genistein - in der Lage ist, das Wachstumsverhalten von MCF-7 konzentrationsabhängig zu beeinflussen. So stimulieren niedrige 17 β -Estradiol-Spiegel die Zellen, während sie bei hohen gehemmt werden. Für die proliferativen Effekte werden dabei ER-abhängige Mechanismen verantwortlich gemacht. Dabei werden sowohl verschiedene genomische, z.B. eine Induktion der bcl-2 Expression, welche die Apoptose hemmt, als auch schnellere, nicht-genomische, Membran-vermittelte Signalmechanismen, z.B. extranukleare Signalwege, die den IGF1R und den EGFR einbeziehen und verschiedene Signalkaskaden aktivieren, diskutiert [Dong L *et al.*, 1999; Song RX, 2006]. Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, ließ sich trotz positivem ER-Status keine relevante Stimulation der Zellproliferation von MCF-7 durch niedrige 17 β -Estradiol-Konzentrationen zeigen. Dies könnte z.T. durch eine zu kurze Inkubationszeit der Zellen erklärt werden, geht man davon aus, dass Wachstumsprozesse zugrunde liegen, welche zunächst auf genetischer Ebene induziert werden müssen. Möglich wäre auch, dass 17 β -Estradiol zwar über den ER α stimulierend wirkt, jedoch auch gleichzeitig eine wachstumsinhibierende Wirkung über den ER β , wahrscheinlich über Einflussnahme auf die Expression von Schlüsselgenen des Zellzyklus, ausübt [Koehler KF *et al.*, 2005]. In der hohen Konzentration zeigte das 17 β -Estradiol dagegen einen hemmenden Effekt auf MCF-7. Dieser war allerdings nur im BrdU-Test deutlich zu sehen. Es ist bekannt, dass es unter Hormonüberschuss zu einer Reduktion der ER mRNA-Level in MCF-7 Zellen *in vitro* kommt, was zu einer Rezeptor-Downregulation und Internalisierung der ER führt, wodurch das Wachstum verringert wird [Pink JJ *et al.*, 1996]. Desweiteren wurden auch die BT20 Zellen, allerdings nur im MTT-Test sichtbar, durch hohe 17 β -Estradiol-Konzentrationen gehemmt. Dies korreliert mit anderen wissenschaftlichen Untersuchungen, in denen ebenfalls ein hemmender Effekt hoher 17 β -Estradiol-Konzentrationen auf ER-negative Mammakarzinomzellen *in vitro* gezeigt wurde [Urazumi K, 1990]. Insgesamt basieren die Hemmeffekte - sowohl bei MCF-7 als auch bei BT20 - vermutlich auf ER-unabhängigen Mechanismen. Dafür spricht auch, dass die Effekte bereits nach kurzer Inkubationszeit der Zellen auftraten, also nicht erst über eine ER-abhängige transkriptionelle Aktivierung ausgelöst werden mussten.

5.2.5. Rolle der Phytoestrogene in den Wirkungen des Wurzelextrakts

In der Massenspektrometrie wurden der Flavonoid- und Lignananteil des *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakts auf 2,4 und 1,9 % beziffert. Hochgerechnet auf die in dieser Arbeit verwendeten, beiden hohen Wurzelextrakt-Konzentrationen, welche starke antikanzerogene Wirkungen auf beide Zelllinien zeigten, würde dies bei einer Extrakt-Konzentration von 500 µg/ml einer Flavonoid- bzw. Lignan-Konzentration von 12 bzw. 9,5 µg/ml, bei 1000 µg/ml einer Konzentration von 24 bzw. 19 µg/ml entsprechen. Da die Phytoestrogene, einzeln betrachtet, jedoch keine relevanten Wirkungen in diesen Konzentrationsbereichen verursachten, wäre anzunehmen, dass sich ihre Wirkungen addieren oder ggf. sogar potenzieren, um schließlich den Effekt des Wurzelextrakts zu erzeugen. Dies setzt aber voraus, dass diese Phytoestrogene die einzigen wirksamen Substanzen in dem hergestellten Wurzelextrakt sind. Sehr viel wahrscheinlicher ist es jedoch, dass eine Reihe anderer Substanzen, die in dem Extrakt enthalten sind, an seiner Wirkung auf die Mammakarzinomzellen *in vitro* beteiligt sind. Die Beobachtung, dass die zytotoxischen/hemmenden Effekte der hohen Wurzelextrakt-Konzentrationen bei den MTT-Tests zwischen 100 und 500 µg/ml, in den BrdU-Tests jedoch schon ab 50 µg/ml beginnen, lässt vermuten, dass wahrscheinlich Mechanismen beteiligt sind, die in die Replikations- und/oder Transkriptionsprozesse der DNA der Zellen eingreifen. Dies könnte durchaus ER-vermittelt ablaufen, zeigen die vorliegenden Ergebnisse doch einen stärkeren Einfluss des Extrakts auf MCF-7 als auf BT20. Im Gegensatz dazu werden für die Hemmeffekte der Phytoestrogene jedoch eher ER-unabhängige Mechanismen vermutet (siehe 5.2.3.). Dies könnte daher ein Hinweis darauf sein, dass die Phytoestrogene, wenn überhaupt, nur eine kleinere Rolle in der antikanzerogenen Wirkung des Wurzelextrakts spielen.

5.2.6. Mögliche Wirkstoffe des *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakts

Wie die Massenspektrometrie zeigt, enthält das in dieser Arbeit hergestellte *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakt zu einem großen Teil Sterole/Triterpene (21,4 %) und freie, langkettige gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (17,8 %). Geht man davon aus, dass nicht nur die Phytoestrogene, sondern mehrere einzelne Substanzen an der antikanzerogenen Wirkung des Extrakts auf die Mammakarzinomzellen beteiligt sind, ist es deswegen naheliegend anzunehmen, dass diese Stoffgruppen einen maßgeblichen Anteil an der Wirkung des Extrakts haben.

Phytosterole, auch Phytosterine genannt, sind Fettbestandteile, die meist als strukturelle Komponenten in der Zellmembran von Pflanzen fungieren. Dabei ist das β -Sitosterin mit ca. 65 % das in der normalen Nahrung am häufigsten vertretene Phytosterin. Untersuchungen

haben gezeigt, dass dieses *in vitro* Apoptose von MCF-7 Zellen auslösen kann [Awad AB *et al.*, 2007]. So werden die Phytosterole seit den letzten Jahren zunehmend als antikanzerogene Substanzen diskutiert [Woyengo TA *et al.*, 2009].

Eine weitere Rolle scheinen auch die Terpene, eine Gruppe von sekundären, meist pflanzlichen Naturstoffen, zu spielen. Insgesamt sind Terpene sehr heterogene Substanzen und weisen eine große Vielfalt auf. Sie werden u.a. als umweltfreundliche Insektizide, antimikrobielle Substanzen oder Geruchs- oder Geschmacksstoffe in Parfümen und kosmetischen Produkten eingesetzt. Für verschiedene Triterpene, wie z.B. Ursolsäure, Ginsenoside, Cucurbitacin wurden aber auch antikanzerogene Effekte auf MCF-7 sowie auf ER-negative Mammakarzinom-Zelllinien *in vitro* gezeigt [Yoon H *et al.*, 2008; Oh M *et al.*, 1999; Tannin-Spitz T *et al.*, 2007].

Auch die langkettigen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren könnten an den Wirkungen des Extrakts beteiligt sein. Hier soll v.a. die α -Linolensäure, welche reichlich in den Samen des Leins vorkommt und eine maßgebliche Rolle an deren antikanzerogenen Wirkungen auf Mammakarzinome *in vivo* (Mäusen) spielen soll, hervorgehoben werden [Chen J *et al.*, 2007; Wang L *et al.*, 2005]. Auch in verschiedenen *in vitro*-Studien wurden hemmende Effekte von ungesättigten Omega-3-Fettsäuren, u.a. der α -Linolensäure, auf Mammakarzinomzellen, auch auf MCF-7, nachgewiesen [Kim JY *et al.*, 2009; Chajès V *et al.*, 1995].

Ferner kommen verschiedene Mykotoxine, wie z.B. Zearalenon bzw. α -Zearalenol, ein dem 17β -Estradiol strukturell sehr ähnlicher Stoff, in Betracht. Diese von Schimmelpilzen (Fusarien) produzierte Substanz, welche zu den Mykoestrogenen gezählt wird, konnte an den Wurzeln des amerikanischen und asiatischen Ginsengs nachgewiesen werden. Es besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu den ER, wobei eine genaue Wirkungsweise allerdings noch nicht beschrieben werden konnte [Gray SL *et al.*, 2004]. Solche oder ähnliche Mykotoxine könnten sich auch an Wurzelbestandteilen des Leins befinden. Deswegen sollte auch an solche oder ähnliche Substanzen gedacht werden.

6. Zusammenfassung

Das Interesse an einer gesunden Lebensweise, einer gesunden Ernährung und pflanzlichen Alternativen zur Schulmedizin hat in den letzten Jahren sehr stark zugenommen. Dabei wird die Stoffklasse der Phytoestrogene u.a. im Hinblick auf die primäre und sekundäre Krebsprävention beim Mammakarzinom sowie als Alternative zur HRT seit Jahren vielfach diskutiert. Aufgrund von *in vivo*-Studien, meist an Mäusen, in denen diätisch zugeführte Leinsamen, welche bekanntermaßen reich an Phytoestrogenen sind, antikanzerogen auf Mammakarzinomzellen wirkten, wurden daraufhin verschiedene Rohextrakte aus verschiedenen Bestandteilen der Leinpflanze bezüglich ihrer Wirkung *in vitro* untersucht. Dabei zeigten sich z.T. vielversprechende Ergebnisse, wobei die Extrakte aus den Wurzeln des Leins am stärksten antikanzerogen zu wirken schienen. Viele Aspekte bezüglich der eigentlich wirksamen Substanzen, insbesondere der Phytoestrogene, sowie deren Signalmechanismen und Wechselwirkungen sind jedoch bei weitem noch nicht verstanden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Herstellung eines ethanolischen Extrakts aus Wurzeln der Leinpflanze (*Linum usitatissimum*) und dessen anschließende Untersuchung bezüglich der Wirkung auf das Wachstum zweier unterschiedlicher Mammakarzinom-Zelllinien, MCF-7 und BT20. Diese wurden zuvor immunhistochemisch untersucht, wobei für MCF-7 die Expression von ER α (+++), ER β (++) und PR (+) an der Zelloberfläche nachgewiesen wurde, wohingegen die BT20-Zelllinie negativ bezüglich dieser Rezeptoren war. Zusätzlich zu dem Wurzelextrakt wurden die Wirkungen verschiedener einzelner Phytoestrogene auf die Karzinomzellen untersucht. Dabei wurden die Isoflavone Genistein und Daidzein, ihre jeweilige glykosidische Form Genistin und Daidzin sowie das Lignan Secoisolariciresinol verwendet. Als Kontrollsubstanzen dienten außerdem das Chemotherapeutikum Tamoxifen sowie das Estrogen 17 β -Estradiol. Die genannten Testsubstanzen wurden dabei in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Um eine qualitative und quantitative Analyse der Inhaltsstoffe des Wurzelextrakts zu erhalten, wurde dieses massenspektrometrisch untersucht, wobei als Hauptinhaltsstoffe hierbei die Stoffklassen der Sterole und Triterpene (21,4 %) sowie der langkettigen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren (17,8 %) gefunden wurden. Die Flavonoide (2,4 %), darunter auch die Isoflavone, und Lignane (1,9 %) dagegen machten nur einen kleinen Teil der Inhaltsstoffe aus.

Die Untersuchungen bezüglich der Wirkungen des Extrakts, der Phytoestrogene sowie der Kontrollsubstanzen auf die Mammakarzinomzellen erfolgte mit Hilfe von drei unterschiedlichen Testverfahren *in vitro*, wobei einerseits die Zytotoxizität (LDH-Test) andererseits der

Einfluss auf Zellvitalität und -proliferationsverhalten (MTT-/BrdU-Test) der Substanzen untersucht wurden.

In den Ergebnissen zeigte das *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakt in seinen hohen Konzentrationen zytotoxische/proliferationshemmende Effekte auf MCF-7 und BT20 *in vitro*, wobei dafür größtenteils ER-abhängige, aber auch ER-unabhängige Wirkmechanismen vermutet werden. Von den einzelnen Phytoestrogenen verursachte v.a. Genistein in hoher Konzentration hemmende Effekte auf beide Zelllinien *in vitro*. Daneben wurde aber auch für Secoisolariciresinol, in hoher Konzentration, eine antikanzerogene Wirkung auf MCF-7 und BT20 *in vitro* gezeigt. Die Phytoestrogene schienen ihre Hemmeffekte dabei hauptsächlich über komplexe ER-unabhängige Mechanismen zu vermitteln. In niedriger Konzentration zeigte Genistein jedoch auch milde proliferationsstimulierende, wahrscheinlich ER-abhängige, Wirkungen. Im Gegensatz zu Genistein verursachte seine glykosidische Form Genistin in hoher Konzentration eine erhöhte Zellproliferation von BT20. Es können deshalb Wirkunterschiede abhängig vom Status der Glykosylierung der Isoflavone vermutet werden. Tamoxifen hemmte beide Zelllinien schon ab niedrigeren Konzentrationen aufwärts, wobei es hauptsächlich über ER-unabhängige Mechanismen zu wirken schien. 17 β -Estradiol verursachte in hoher Konzentration ebenfalls eine Hemmung beider Zelllinien. Auch hier entstand der Eindruck, dass die ER in der Signaltransduktion unbeteiligt sind. Die BT20 Zellen konnten durch niedrige Estradiol-Konzentrationen stimuliert werden, was zeigt dass diese ER-unabhängig zur Proliferation angeregt werden können.

Zusammengefasst spielen ER-abhängige Wirkmechanismen in den durch die Phytoestrogene und Kontrollsubstanzen verursachten Hemmungen der hier verwendeten Mammakarzinomzellen wahrscheinlich keine bedeutende Rolle, zumindest was die BT20 Zellen angeht. Wahrscheinlicher ist eine Beteiligung von ER-unabhängigen Wirkmechanismen an den antikanzerogenen Wirkungen, wobei in den letzten Jahren eine Vielzahl diskutiert wurde. Bisher gibt es jedoch keine klaren Ergebnisse. Vergleicht man die Wirkungen des Wurzelextrakts mit denen der einzelnen Phytoestrogene, lässt sich zusammenfassend vermuten, dass die Phytoestrogene zwar an der Wirkung des Extrakts beteiligt sein mögen, das Extrakt als pflanzliches Vielstoffgemisch jedoch über zahlreiche andere Inhaltsstoffe verfügt, welche nachweislich antikanzerogen auf Mammakarzinomzellen wirken können. Somit setzt sich die Wirkung des Wurzelextrakts wahrscheinlich aus einem komplexen Zusammenspiel mehrerer bekannter und noch unbekannter Substanzen zusammen.

7. Ausblick

Die Thematik dieser Arbeit sowie die ihr zugrunde liegende Zielsetzung und ausgewählten Methoden sind der onkologischen Grundlagenforschung zuzuordnen. In dieser Arbeit wurden Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit eines ethanolischen *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakts auf das Wachstum von Mammakarzinomzellen *in vitro* sowie einer Beteiligung verschiedener Phytoestrogene und anderer Inhaltsstoffe an den Wirkungen des Extrakts erzielt. In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit und den wenigen vorhandenen Studien über die Wirkung der Leinwurzel auf humane Zellen, steht die Forschung hier jedoch noch am Anfang der Entwicklung. Es bedarf nun weitergehender Untersuchungen, um die entscheidenden Substanzen zu isolieren sowie deren Wirkmechanismen zu entschlüsseln. Dazu könnten u.a. folgende Experimente durchgeführt werden:

- Genauere Aufschlüsselung des Wurzelextrakts bzw. seiner einzelnen Stoffklassen durch z.B. fraktionierte Chromatographie oder erneute Massenspektrometrie der einzelnen Fraktionen
- Kombination des Wurzelextrakts mit bekannten Chemotherapeutika (z.B. Tamoxifen) zur Beurteilung sich potenzierender oder beeinflussender Effekte
- Testung verschiedener Phytoestrogen-Kombinationen bzw. Kombinationen von Phytoestrogenen mit bekannten Chemotherapeutika (z.B. Tamoxifen)
- Testung des Wurzelextrakts und der Phytoestrogene unter Blockade der ER
- Testung weiterer Phytoestrogene bzw. deren Konjugate/Derivate, insbesondere END und ENL
- Durchführung von *in vivo*-Studien zur Klärung des Stoffwechsels und der Bioverfügbarkeit der Leinwurzel bzw. möglichen wirksamen Substanzen im Brustgewebe
- Messung der Veränderung des ER-Status unter Wurzelextrakt-Inkubation
- Untersuchungen von Apoptose-Mechanismen
- Untersuchung weiterer möglicher Zellrezeptoren der Mammakarzinomzellen
- Untersuchung des Leinwurzelextrakts am Mausmodell mit heterotransplantierten Mammakarzinomen

Es stellt sich außerdem die Frage, ob die Phytoestrogene in Form von Isoflavonen und Lignanen ein medizinisches Potential als HRT bei klimakterischen Beschwerden haben. Diesbezüglich gibt es trotz zahlreicher Studien noch immer keine klaren Empfehlungen. Da die in der Leinwurzel enthaltenen Isoflavone und Lignane nur einen mengenmäßig geringen

Anteil darstellen, scheint eine perspektivische Nutzung der Leinwurzel diesbezüglich aber eher unwahrscheinlich. Vielversprechender dagegen ist die in dieser Arbeit gezeigte antikanzerogene Wirkung des Wurzelextrakts in hohen Konzentrationen. Es kann durchaus der Schluss zugelassen werden, dass die Leinwurzel ein chemotherapeutisches bzw. präventives Potential zur Behandlung von Mammakarzinomen hat. Aussagen zu einer eventuellen klinischen Nutzung des Extrakts sind zu diesem Zeitpunkt jedoch, aufgrund mangelnder Kenntnis, was sowohl die Wirkstoffe und deren Mechanismen als auch deren Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit im menschlichen Organismus betrifft, noch verfrüht.

8. Literaturverzeichnis

- [1] *Abarzua S, Szewczyk M, Gailus S, Richter DU, Ruth W, Briese V, Piechulla B* (2007) Effects of phytoestrogen extracts from *Linum usitatissimum* on the Jeg3 human trophoblast tumour cell line. *Anticancer Res.* 27(4A): 2053-8
- [2] *Adlercreutz H* (1990) Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 201: 3-23
- [3] *Adlercreutz H, Fotsis T, Lampe J, Wähälä K, Mäkelä T, Brunow G, Hase T* (1993) Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 215: 5-18
- [4] *Adlercreutz H, Bannwart C, Wähälä K, Mäkelä T, Brunow G, Hase T, Arosemena PJ, Kellis JT Jr, Vickery LE* (1993) Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 44(2): 147-53
- [5] *Adlercreutz H* (1995) Phytoestrogens: Epidemiology and a possible Role in Cancer Protection. *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 7: 103-12
- [6] *Adlercreutz H, van der Wildt J, Kinzel J, Attalla H, Wähälä K, Mäkelä T, Hase T, Fotsis T* (1995) Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 52(1): 97-103
- [7] *Adlercreutz H* (1998) Epidemiology of phytoestrogens. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 12(4): 605-23
- [8] *Adlercreutz H* (2002) Phytoestrogens and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 83(1-5): 113-8
- [9] *Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y* (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 262(12): 5592-5
- [10] *An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N, Leitman DC* (2001) Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem.* 276(21): 17808-14
- [11] *Ariga T, Seki T* (2006) Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review. *Biofactors.* 26(2): 93-103
- [12] *Arora A, Nair MG, Strasburg GM* (1998) Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch Biochem Biophys.* 356(2): 133-41
- [13] *Awad AB, Chinnam M, Fink CS, Bradford PG* (2007) beta Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomedicine.* 14(11): 747-54

- [14] *Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH* (2008) Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett.* 269(2): 226-42
- [15] *Bardon S, Vignon F, Derocq D, Rochefort H* (1984) The antiproliferative effect of tamoxifen in breast cancer cells: mediation by the estrogen receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 35(2-3): 89-96
- [16] *Bachmann-Moisson N, Barberi-Heyob M, Merlin JL, Ledrich ML, Batt AM, Guillemin F* (1996) Cytotoxicity of tamoxifen and its principal metabolites in human breast cancer cell lines. *Bull Cancer.* 83(10): 808-15
- [17] *Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL* (1946) A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Br Vet J.* 102(11): 348-52
- [18] *Bergmann Jungeström M, Thompson LU, Dabrosin C* (2007) Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo. *Clin Cancer Res.* 13(3): 1061-7
- [19] *Bitsch R* (1999) Pflanzliche Phenole und ihre gesundheitliche Wirkung. *VitaMinSpur.* 14: 16-20
- [20] *Bowey E, Adlercreutz H, Rowland I* (2003) Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food Chem Toxicol.* 41(5): 631-6
- [21] *Boyan BD, Sylvia VL, Frambach T, Lohmann CH, Dietl J, Dean DD, Schwartz Z* (2003) Estrogen-dependent rapid activation of protein kinase C in estrogenreceptor positive MCF-7 breast cancer cells and in estrogen-receptor negative HCC38 cells is membrane-mediated and inhibited by tamoxifen. *Endocrinology.* 144(5): 1812-24
- [22] *Brandes LJ, Hermonat MW* (1983) Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Res.* 43(6): 2831-5
- [23] *Brooks SC, Locke ER, Soule HD* (1973) Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem.* 248(17): 6251-3
- [24] *Cappelletti V, Fioravanti L, Miodini P, Di Fronzo G* (2000) Genistein blocks breast cancer cells in the G(2)M phase of the cell cycle. *J Cell Biochem.* 79(4): 594-600
- [25] *Caragay AB* (1992) Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technol.* 46(4): 65-68
- [26] *Cassidy A, Hooper L* (2006) Phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Br Menopause Soc.* 12(2): 49-56
- [27] *Castles CG, Fuqua SA, Klotz DM, Hill SM* (1993) Expression of a constitutively active estrogen receptor variant in the estrogen receptor-negative BT-20 human breast cancer cell line. *Cancer Res.* 53(24): 5934-9

- [28] *Chajès V, Sattler W, Stranzl A, Kostner GM* (1995) Influence of n-3 fatty acids on the growth of human breast cancer cells in vitro: relationship to peroxides and vitamin-E. *Breast Cancer Res Treat.* 34(3): 199-212
- [29] *Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR* (2000) Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr.* 130(8): 1963-70
- [30] *Chang YC, Nair MG* (1995) Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *J Nat Prod.* 58(12): 1892-6
- [31] *Chen J, Stavro PM, Thompson LU* (2002) Dietary flaxseed inhibits human breast cancer growth and metastasis and downregulates expression of insulin-like growth factor and epidermal growth factor receptor. *Nutr Cancer.* 43(2): 187-92
- [32] *Chen J, Power KA, Mann J, Cheng A, Thompson LU* (2007) Flaxseed alone or in combination with tamoxifen inhibits MCF-7 breast tumor growth in ovariectomized athymic mice with high circulating levels of estrogen. *Exp Biol Med (Maywood).* 232(8): 1071-80
- [33] *Chen WF, Huang MH, Tzang CH, Yang M, Wong MS* (2003) Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochim Biophys Acta.* 1638(2): 187-96
- [34] *Choi EJ, Kim GH* (2008) Daidzein causes cell cycle arrest at the G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells. *Phytomedicine.* 15(9): 683-90
- [35] *Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Hancke U, Levinson A, Ullrich A* (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science.* 230(4730): 1132-9
- [36] *Coward L, Smith M, Kirk M, Barnes S* (1998) Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am J Clin Nutr.* 68(6 Suppl): 1486S-1491S
- [37] *Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G* (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* 436(1): 71-5
- [38] *Deapen D, Liu L, Perkins C, Bernstein L, Ross RK* (2002) Rapidly rising breast cancer incidence rates among Asian-American women. *Int J Cancer.* 99(5): 747-50
- [39] *de Cremoux P, This P, Leclercq G, Jacquot Y* (2010) Controversies concerning the use of phytoestrogens in menopause management: bioavailability and metabolism. *Maturitas.* 65(4): 334-9
- [40] *Degen GH* (1990) Interaction of phytoestrogens and other environmental estrogens with prostaglandin synthase in vitro. *J Steroid Biochem.* 35(3-4): 473-9
- [41] *de Lemos ML* (2001) Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. *Ann Pharmacother.* 35(9): 1118-21

- [42] *Deluca D, Krazeisen A, Breitling R, Prehn C, Möller G, Adamski J* (2005) Inhibition of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases by phytoestrogens: comparison with other steroid metabolizing enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 93(2-5): 285-92
- [43] *Di Virgilio AL, Iwami K, Wätjen W, Kahl R, Degen GH* (2004) Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicol Lett.* 151(1): 151-62
- [44] *Dong L, Wang W, Wang F, Stoner M, Reed JC, Harigai M, Samudio I, Kladde MP, Vyhldal C, Safe S* (1999) Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 274(45): 32099-107
- [45] *Dopp E, Vollmer G, Hahnel C, Grevesmühl Y, Schiffmann D* (1999) Modulation of the intracellular calcium level in mammalian cells caused by 17beta-estradiol, different phytoestrogens and the anti-estrogen ICI 182780. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 68(1-2): 57-64
- [46] *Duarte J, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J* (1997) Effect of tyrosine kinase and tyrosine phosphatase inhibitors on aortic contraction and induction of nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 338(1): 25-33
- [47] *Evans BA, Griffiths K, Morton MS* (1995) Inhibition of 5 alpha-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J Endocrinol.* 147(2): 295-302
- [48] *Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L* (1993) Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(7): 2690-4
- [49] *Franke W* (1997) *Nutzpflanzenkunde - Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen.* 6., neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- [50] *Furuya Y, Kohno N, Fujiwara Y, Saitoh Y* (1989) Mechanisms of estrogen action on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells in an improved culture medium. *Cancer Res.* 49(23): 6670-4
- [51] *Garcia I, Dietrich PY, Aapro M, Vauthier G, Vadas L, Engel E* (1989) Genetic alterations of c-myc, c-erbB-2, and c-Ha-ras protooncogenes and clinical associations in human breast carcinomas. *Cancer Res.* 49(23): 6675-9
- [52] *Gikas PD, Mokbel K* (2005) Phytoestrogens and the risk of breast cancer: a review of the literature. *Int J Fertil Womens Med.* 50(6): 250-8
- [53] *Gray SL, Lackey BR, Tate PL, Riley MB, Camper ND* (2004) Mycotoxins in root extracts of American and Asian ginseng bind estrogen receptors alpha and beta. *Exp Biol Med (Maywood).* 229(6): 560-8
- [54] *Gundimeda U, Chen ZH, Gopalakrishna R* (1996) Tamoxifen modulates protein kinase C via oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J Biol Chem.* 271(23): 13504-14

- [55] *Hall JM, McDonnell DP* (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*. 140(12): 5566-78
- [56] *Heinonen S, Wähälä K, Adlercreutz H* (1999) Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds. *Anal Biochem*. 274(2): 211-9
- [57] *Hennessey C, Henry JA, May FE, Westley BR, Angus B, Lennard TW* (1991) Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 83(4): 281-5
- [58] *Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis CA, Khaled H, Liu MC, Martin M, Namer M, O'*
- [59] *Shaughnessy JA, Shen ZZ, Albain KS* (2005) ABREAST Investigators. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer*. 6(5): 391-401
- [60] *Hoikkala AA, Schiavoni E, Wähälä K* (2003) Analysis of phyto-oestrogens in biological matrices. *Br J Nutr*. 89 Suppl 1: 5-18
- [61] *Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG* (1998) Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 58 (17): 3833-8
- [62] *Hur HG, Lay JO Jr, Beger RD, Freeman JP, Rafii F* (2000) Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol*. 174(6): 422-8
- [63] *Hur HG, Beger RD, Heinze TM, Lay JO Jr, Freeman JP, Dore J, Rafii F* (2002) Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein. *Arch Microbiol*. 178(1): 8-12
- [64] *Jansen GH, Arts IC, Nielen MW, Müller M, Hollman PC, Keijer J* (2005) Uptake and metabolism of enterolactone and enterodiol by human colon epithelial cells. *Arch Biochem Biophys*. 435(1): 74-82
- [65] *Kim H, Peterson TG, Barnes S* (1998) Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. *Am J Clin Nutr*. 68(6 Suppl): 1418S-1425S
- [66] *Kim JY, Park HD, Park E, Chon JW, Park YK* (2009) Growth-inhibitory and proapoptotic effects of alpha-linolenic acid on estrogen-positive breast cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1171: 190-5
- [67] *King RA, Bursill DB* (1998) Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am J Clin Nutr*. 67(5): 867-72

- [68] *Koehler KF, Helguero LA, Haldosén LA, Warner M, Gustafsson JA* (2005) Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev.* 26(3): 465-78
- [69] *Kreutzig T* (2000) Kurzlehrbuch Biochemie. 10. Auflage. Urban & Fischer, München, Jena
- [70] *Kuijsten A, Arts IC, Vree TB, Hollman PC* (2005) Pharmacokinetics of enterolignans in healthy men and women consuming a single dose of secoisolariciresinol diglucoside. *J Nutr.* 135(4): 795-801
- [71] *Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA* (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 139(10): 4252-63
- [72] *Kulling SE, Rosenberg B, Jacobs E, Metzler M* (1999) The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol.* 73(1): 50-4
- [73] *Kulling SE, Honig DM, Metzler M* (2001) Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem.* 49(6): 3024-33
- [74] *Kulling SE, Watzl B* (2003) Phytoöstrogene. *Ernährungs-Umschau, Basiswissen aktualisiert.* 50 (6): 234-9
- [75] *Kurzer MS, Xu X* (1997) Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr.* 17: 353-81
- [76] *Lange CA* (2008) Challenges to defining a role for progesterone in breast cancer. *Steroids.* 73(9-10): 914-21
- [77] *Lamartiniere CA* (2000) Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *Am J Clin Nutr.* 71(6 Suppl): 1705S-7S; discussion 1708S-9S
- [78] *Lampe JW* (2003) Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J Nutr.* 133 Suppl 3: 956S-964S
- [79] *Lampe JW, Atkinson C, Hullar MA* (2006) Assessing exposure to lignans and their metabolites in humans. *J AOAC Int.* 89(4): 1174-81
- [80] *Lee EY, To H, Shew JY, Bookstein R, Scully P, Lee WH* (1988) Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science.* 241(4862): 218-21
- [81] *Leung LK, Wang TT* (2000) Bcl-2 is not reduced in the death of MCF-7 cells at low genistein concentration. *J Nutr.* 130(12): 2922-6
- [82] *Levin ER* (2002) Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids.* 67(6): 471-5
- [83] *Liggins J, Grimwood R, Bingham SA* (2000) Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples. *Anal Biochem.* 287(1): 102-9

- [84] *Luyengi L, Suh N, Fong HH, Pezzuto JM, Kinghorn AD* (1996) A lignan and four terpenoids from *Brucea javanica* that induce differentiation with cultured HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Phytochemistry*. 43(2): 409-12
- [85] *Lung JC, Chu JS, Yu JC, Yue CT, Lo YL, Shen CY, Wu CW* (2002) Aberrant expression of cell-cycle regulator cyclin D1 in breast cancer is related to chromosomal genomic instability. *Genes Chromosomes Cancer*. 34(3): 276-84
- [86] *Maggiolini M, Bonofiglio D, Marsico S, Panno ML, Cenni B, Picard D, Andò S* (2001) Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol*. 60(3): 595-602
- [87] *Manavathi B, Kumar R* (2006) Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: two sides of the coin. *J Cell Physiol*. 207(3): 594-604
- [88] *McCarty MF* (2006) Isoflavones made simple - genistein's agonist activity for the beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. *Med Hypotheses*. 66(6): 1093-114
- [89] *Mense SM, Hei TK, Ganju RK, Bhat HK* (2008) Phytoestrogens and breast cancer prevention: possible mechanisms of action. *Environ Health Perspect*. 116(4): 426-33
- [90] *Messina M, McCaskill-Stevens W, Lampe JW* (2006) Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *J Natl Cancer Inst*. 98(18): 1275-84
- [91] *Messina MJ, Wood CE* (2008) Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. *Nutr J*. 7: 17
- [92] *Moharram FA, El-Shenawy SM* (2007) Antinociceptive and anti-inflammatory steroidal saponins from *Dracaena ombet*. *Planta Med*. 73(10): 1101-6
- [93] *Murkies AL, Wilcox G, Davis SR* (1998) Clinical review 92: Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab*. 83(2): 297-303
- [94] *Mousavi Y, Adlercreutz H* (1993) Genistein is an effective stimulator of sex hormonebinding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids*. 58: 301-304
- [95] *Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG, Katzenellenbogen JA* (2004) Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem*. 12(6): 1559-67
- [96] *Nadal A, Ropero AB, Fuentes E, Soria B* (2001) The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear? *Trends Pharmacol Sci*. 22(12): 597-9
- [97] *Nesbitt PD, Lam Y, Thompson LU* (1999) Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed. *Am J Clin Nutr*. 69(3): 549-55

- [98] *Niemeyer HB, Honig D, Lange-Böhmer A, Jacobs E, Kulling SE, Metzler M* (2000) Oxidative metabolites of the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in rat bile and urine. *J Agric Food Chem.* 48(7): 2910-9
- [99] *Niemeyer HB, Honig DM, Kulling SE, Metzler M* (2003) Studies on the metabolism of the plant lignans secoisolariciresinol and matairesinol. *J Agric Food Chem.* 51(21): 6317-25
- [100] *Oh M, Choi YH, Choi S, Chung H, Kim K, Kim SI, Kim DK, Kim ND* (1999) Anti-proliferating effects of ginsenoside Rh2 on MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Oncol.* 14(5): 869-75
- [101] *Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan VC* (2008) Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta Med.* 74(13): 1656-65
- [102] *Otto AM, Paddenbergh R, Schubert S, Mannherz HG* (1996) Cell-cycle arrest, micronucleus formation, and cell death in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells by tamoxifen and cisplatin. *J Cancer Res Clin Oncol.* 122(10): 603-12
- [103] *Panlasigui LN, Thompson LU* (2006) Blood glucose lowering effects of brown rice in normal and diabetic subjects. *Int J Food Sci Nutr.* 57(3-4): 151-8
- [104] *Pelissero C, Lenczowski MJ, Chinzi D, Davail-Cuisset B, Sumpter JP, Fostier A* (1996) Effects of flavonoids on aromatase activity, an in vitro study. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 57(3-4): 215-23
- [105] *Peñalvo JL, Nurmi T, Haajanen K, Al-Maharik N, Botting N, Adlercreutz H* (2004) Determination of lignans in human plasma by liquid chromatography with coulometric electrode array detection. *Anal Biochem.* 332(2): 384-93
- [106] *Perry R, Kang Y, Greaves B* (1995) Effects of tamoxifen on growth and apoptosis of estrogen-dependent and -independent human breast cancer cells. *Ann Surg Oncol.* 2(3): 238-45
- [107] *Perry RR, Kang Y, Greaves BR* (1995) Relationship between tamoxifen-induced transforming growth factor beta 1 expression, cytostasis and apoptosis in human breast cancer cells. *Br J Cancer.* 72(6): 1441-6
- [108] *Peterson G* (1996) Genistein inhibits both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Cell Growth Differ.* 7(10): 1345-51
- [109] *Pink JJ, Jordan VC* (1996) Models of estrogen receptor regulation by estrogens and antiestrogens in breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 56(10): 2321-30
- [110] *Piskula MK, Yamakoshi J, Iwai Y* (1999) Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett.* 447(2-3): 287-91
- [111] *Polkowski K, Mazurek AP* (2000) Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm.* 57(2): 135-55

- [112] *Polkowski K, Popiołkiewicz J, Krzeczyński P, Ramza J, Pucko W, Zegrocka-Stendel O, Boryski J, Skierski JS, Mazurek AP, Grynkiewicz G* (2004) Cytostatic and cytotoxic activity of synthetic genistein glycosides against human cancer cell lines. *Cancer Lett.* 203(1): 59-69
- [113] *Poulsen RC, Kruger MC* (2008) Soy phytoestrogens: impact on postmenopausal bone loss and mechanisms of action. *Nutr Rev.* 66(7): 359-74
- [114] *Probst-Hensch NM, Pike MC, McKean-Cowdin R, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Henderson BE* (2000) Ethnic differences in post-menopausal plasma oestrogen levels: high oestrone levels in Japanese-American women despite low weight. *Br J Cancer.* 82(11): 1867-70
- [115] *Rice S, Whitehead SA* (2006) Phytoestrogens and breast cancer--promoters or protectors? *Endocr Relat Cancer.* 13(4): 995-1015
- [116] *Riede UN, Werner M, Schaefer HE* (2004) Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme, Stuttgart, 5. komplett überarb. Aufl. S.340-342; S.373-378
- [117] Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg) (2010) Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Berlin
- [118] *Rowland I, Wiseman H, Sanders T, Adlercreutz H, Bowey E* (1999) Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora. *Biochem Soc Trans.* 27(2): 304-8
- [119] *Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA* (2000) Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer.* 36(1): 27-32
- [120] *Saarinen NM, Wärrä A, Dings RP, Airio M, Smeds AI, Mäkelä S* (2008) Dietary laraicresinol attenuates mammary tumor growth and reduces blood vessel density in human MCF-7 breast cancer xenografts and carcinogen-induced mammary tumors in rats. *Int J Cancer.* 123(5): 1196-204
- [121] *Sarkar FH, Adsule S, Padhye S, Kulkarni S, Li Y* (2006) The role of genistein and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy. *Mini Rev Med Chem.* 6(4): 401-7
- [122] *Sathyamoorthy N, Wang TT* (1997) Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. *Eur J Cancer.* 33(14): 2384-9
- [123] *Setchell KD, Adlercreutz H* (1988) Mammalian lignans and phytoestrogens. Recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease. In: Rowland I, ed. Role of the gut flora in toxicity and cancer. London: Academic Press; 315-345
- [124] *Setchell KD, Cassidy A* (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr.* 129(3): 758S-767S
- [125] *Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE* (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr.* 131(4 Suppl): 1362S-75S

- [126] *Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE* (2002) Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 76(2): 447-53
- [127] *Setchell KD, Faughnan MS, Avades T, Zimmer-Nechemias L, Brown NM, Wolfe BE, Brashear WT, Desai P, Oldfield MF, Botting NP, Cassidy A* (2003) Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 77(2): 411-9
- [128] *Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S* (1997) Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J Nutr.* 127(7): 1260-8
- [129] *Shao ZM, Shen ZZ, Fontana JA, Barsky SH* (2000) Genistein's "ER-dependent and independent" actions are mediated through ER pathways in ER-positive breast carcinoma cell lines. *Anticancer Res.* 20(4): 2409-1
- [130] *Shelnutt SR, Cimino CO, Wiggins PA, Ronis MJ, Badger TM* (2002) Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am J Clin Nutr.* 76(3): 588-94
- [131] *Shim HY, Park JH, Paik HD, Nah SY, Kim DS, Han YS* (2007) Genistein induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves calpain-caspase and apoptosis signaling kinase 1-p38 mitogen-activated protein kinase activation cascades. *Anticancer Drugs.* 18(6): 649-57
- [132] *Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM* (1991) Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer.* 63(6): 963-6
- [133] *Sirtori CR, Arnoldi A, Johnson SK* (2005) Phytoestrogens: end of a tale? *Ann Med.* 37(6): 423-38
- [134] *Smith CL, O'Malley BW* (2004) Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev.* 25(1): 45-71
- [135] *Song RX, Santen RJ* (2006) Membrane initiated estrogen signaling in breast cancer. *Biol Reprod.* 75(1): 9-16
- [136] *Strauss L, Santti R, Saarinen N, Streng T, Joshi S, Mäkelä S* (1998) Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicol Lett.* 102-103: 349-54
- [137] *Swaby RF, Sharma CG, Jordan VC* (2007) SERMs for the treatment and prevention of breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord.* 8(3): 229-39
- [138] *Szewczyk M* (2007) Untersuchungen zum Einfluss von Pflanzenextrakten aus der Leinpflanze *Linum usitatissimum* auf die Zellproliferation und Cytotoxizität humaner Karzinomzellen sowie Trophoblasten und Fibroblasten. Diplomarbeit. Institut für Biowissenschaften, Rostock

- [139] *Tannin-Spitz T, Grossman S, Dovrat S, Gottlieb HE, Bergmann M* (2007) Growth inhibitory activity of curcubitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 73: 56-67
- [140] *Tommasi S, Fedele V, Crapolicchio A, Bellizzi A, Paradiso A, Reshkin SJ* (2003) ErbB2 and the antimetastatic nm23/NDP kinase in regulating serum induced breast cancer invasion. *Int J Mol Med.* 12(1): 131-4
- [141] *Trisomboon H, Malaivijitnond S, Watanabe G, Taya K* (2005) Ovulation block by *Pueraria mirifica*: a study of its endocrinological effect in female monkeys. *Endocrine.* 26(1): 33-9
- [142] *Trock BJ, Hilakivi-Clarke L, Clarke R* (2006) Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 98(7): 459-71
- [143] *Urazumi K* (1990) Human breast cancer cells under serum-free culture. Its hormone-dependency and application to the primary culture. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 91(6): 718-28
- [144] *Ursin G, Bernstein L, Pike MC* (1994) Breast cancer. *Cancer Surv.* 19-20: 241-64
- [145] *Usui T* (2006) Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr J.* 53(1): 7-20
- [146] *van der Woude H, Ter Veld MG, Jacobs N, van der Saag PT, Murk AJ, Rietjens IM* (2005) The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. *Mol Nutr Food Res.* 49(8): 763-71
- [147] *Vakil RJ* (1949) A clinical trial of *Rauwolfia serpentina* in essential hypertension. *Br Heart J.* 11(4): 350-5
- [148] *Varley JM, Armour J, Swallow JE, Jeffreys AJ, Ponder BA, T'Ang A, Fung YK, Brammar WJ, Walker RA* (1989) The retinoblastoma gene is frequently altered leading to loss of expression in primary breast tumours. *Oncogene.* 4(6): 725-9
- [149] *Viereck V, Gründker C, Blaschke S, Siggelkow H, Emons G, Hofbauer LC* (2002) Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. *J Cell Biochem.* 84(4): 725-35
- [150] *Waite KA, Sinden MR, Eng C* (2005) Phytoestrogen exposure elevates PTEN levels. *Hum Mol Genet.* 14(11): 1457-63
- [151] *Wang C, Kurzer MS* (1997) Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutr Cancer.* 28(3): 236-47
- [152] *Wang HJ, Murphy PA* (1994) Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J Agric Food Chem.* 42: 1674-1677
- [153] *Wang L, Chen J, Thompson LU* (2005) The inhibitory effect of flaxseed on the growth and metastasis of estrogen receptor negative human breast cancer xenografts is attributed to both its lignan and oil components. *Int J cancer.* 116(5): 793-8

- [154] Warri A, Saarinen NM, Makela S, Hilakivi-Clarke L (2008) The role of early life genistein exposures in modifying breast cancer risk. *Br J Cancer*. 98(9): 1485-93
- [155] Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wähälä K, Adlercreutz H (1998) Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr*. 128(10): 1710-5
- [156] Wilkinson AP, Gee JM, Dupont MS, Needs PW, Mellon FA, Williamson G, Johnson IT (2003) Hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase is the first step in the uptake of daidzein glucosides by rat small intestine in vitro. *Xenobiotica*. 33(3): 255-64
- [157] Woyengo TA, Ramprasath VR, Jones PJ (2009) Anticancer effects of phytosterols. *Eur J Clin Nutr*. 63(7): 813-20
- [158] Xu J, Loo G (2001) Different effects of genistein on molecular markers related to apoptosis in two phenotypically dissimilar breast cancer cell lines. *J Cell Biochem*. 82(1): 78-88
- [159] Yoon H, Liu RH (2008) Effect of 2alpha-hydroxyursolic acid on NF-kappaB activation induced by TNF-alpha in human breast cancer MCF-7 cells. *J Agric Food Chem*. 56(18): 8412-7
- [160] Zava DT, Duwe G (1997) Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. *Nutr Cancer*. 27(1): 31-40
- [161] Zhang W, Couldwell WT, Song H, Takano T, Lin JH, Nedergaard M (2000) Tamoxifen-induced enhancement of calcium signaling in glioma and MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res*. 60(19): 5395-400
- [162] Zhang Y, Song TT, Cunnick JE, Murphy PA, Hendrich S (1999) Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J Nutr*. 129(2): 399-405
- [163] Zhang Y, Hendrich S, Murphy P (2003) Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. *J Nutr*. 133(2): 399-404
- [164] Zheng A, Kallio A, Härkönen P (2007) Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology*. 148(6): 2764-77
- [165] Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, Hyer MB (1993) Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst*. 85(22): 1819-27

9. Thesen

1. Das Mammakarzinom ist mit Abstand die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen. Derzeit existieren keine klaren Empfehlungen für eine präventive Einnahme von Nahrungsergänzungs- oder Arzneimitteln.
2. Für die Behandlung des Mammakarzinoms existiert bereits eine Vielzahl potenter Chemotherapeutika. Dazu zählen Zytostatika, Antikörper und Immunmodulatoren. Es gilt jedoch trotzdem, ergänzend neue therapeutische Wirkstoffe bzw. Präventivstoffe zu finden. Pflanzen könnten dabei vielversprechende Ressourcen sein.
3. Der Lein (*Linum usitatissimum*) ist eine einheimische Pflanze, deren Bestandteile traditionell als Heilmittel genutzt werden. Experimentelle Studien mit Leinbestandteilen zeigten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* antikanzerogene Wirkungen auf Mammakarzinome. Dafür wurde in der Vergangenheit hauptsächlich die Stoffklasse der Phytoestrogene verantwortlich gemacht.
4. Phytoestrogene sind sekundäre Pflanzenstoffe, deren Struktur und Wirkungen z.T. dem endogenen Estrogen ähneln. Nach oraler Aufnahme von Isoflavonen bzw. Lignanen kommen diese zum Großteil als Aglykone bzw. Enterodiol und Enterolacton in der Peripherie vor.
5. Phytoestrogene können bewiesenermaßen zahlreiche verschiedene Effekte auf zellulärer und körperlicher Ebene ausüben. Viele von diesen resultieren in einer antikanzerogenen Wirkung. Es gibt momentan jedoch keine Empfehlungen hinsichtlich einer klinischen Nutzung.
6. Das in dieser Arbeit hergestellte *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakt enthält eine Vielzahl an verschiedenen Stoffklassen, hauptsächlich Sterole und Triterpene (21,4 %) sowie langkettige gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (17,8 %). Die Gruppe der Phytoestrogene dagegen macht nur einen kleinen Teil aus, wobei die Flavonoide, darunter auch die Isoflavone, mit 2,4 % und die Lignane mit 1,9 % vertreten sind.

7. Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen bezüglich der Hormonrezeptor-Expression ergibt sich ein positiver Rezeptorstatus für MCF-7 (ER α : +++, ER β : ++, PR: +), jedoch ein negativer für BT20.
8. Das nach *Luyengi L et al. (1996)* hergestellte ethanolische Wurzelextrakt wirkt in hohen Konzentrationen signifikant antikanzerogen auf das Wachstum von MCF-7 und BT20 *in vitro*, wobei die MCF-7 Zellen stärker betroffen sind.
9. Die Phytoestrogene Genistein und Secoisolariciresinol verursachen in hohen Konzentrationen ebenfalls antikanzerogene Effekte auf MCF-7 und BT20 *in vitro*.
10. Es scheint, dass Isoflavone abhängig vom Status ihrer Glykosylierung unterschiedliche Wirkungen auf Karzinomzellen *in vitro* ausüben können.
11. Tamoxifen wirkt schon in niedrigeren Konzentrationen sowohl auf MCF-7 als auch auf BT20 antikanzerogen *in vitro*. 17 β -Estradiol verursacht in hohen Konzentrationen teilweise antikanzerogene Effekte auf MCF-7 und BT20 *in vitro*.
12. Für die antikanzerogenen Effekte der Leinwurzel werden hauptsächlich ER-abhängige aber auch ER-unabhängige, für die von Genistein und Secoisolariciresinol größtenteils ER-unabhängige Mechanismen angenommen.
13. Der Anteil der Phytoestrogene an den Wirkungen des Leinwurzelextrakts ist wahrscheinlich gering. Vermutlich fungiert das Extrakt als pflanzliches Vielstoffgemisch, wobei sich seine Wirkung aus der Summe der Effekte verschiedener Inhaltsstoffe zusammensetzt. Die relevanten Inhaltsstoffe sowie deren Mechanismen lassen sich bis jetzt nur teilweise erahnen. Hier bedarf es weitergehender Forschung.

10. Anhang

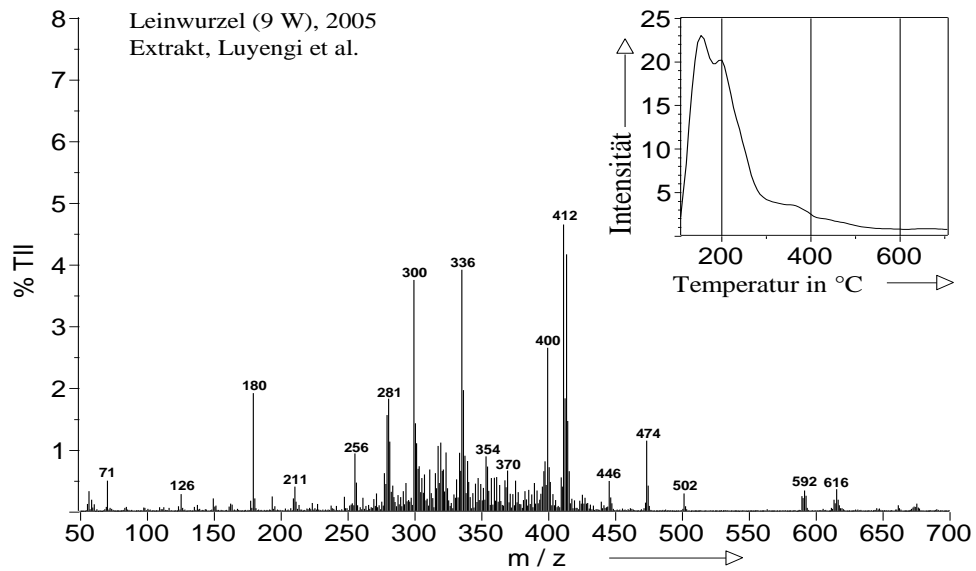


Abb. 48: Darstellung des Thermogramms der Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie des untersuchten *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakts (Konzentration: 100 mg/ml) mit den verschiedenen Massenspektren und den jeweils dazugehörigen Anteilen an der TII in %

11. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken bei:

- meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. V. Briese, für die Vergabe dieses interessanten Themas, die fachliche Unterstützung mit guten Ideen und Ratschlägen sowie die freundliche Zusammenarbeit und Geduld,
- meiner Betreuerin Frau Dr. D.-U. Richter für die sehr hilfreichen theoretischen und praktischen Anleitungen bei der Laborarbeit sowie die vielen netten Gespräche,
- Herrn Dr. A. Schlichting vom Steinbeis-Transfer-Zentrum in Groß Lüsewitz für die massenspektrometrischen Analysen und Erklärungen,
- Frau E. Greschkowitz für die Unterstützung bei der Laborarbeit,
- Frau C. Bauer vom Institut für Biowissenschaften in Rostock für die Hilfe bei der Extrakterstellung,
- Frau PD Dr. S. Abarzua vom Institut für Biowissenschaften in Rostock für den fachlichen Meinungsaustausch und die Gutachtertätigkeit,
- Herrn Prof. Dr. U. Jeschke von der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Gutachtertätigkeit,
- dem gesamten Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock für die gute Atmosphäre und Zusammenarbeit,
- und zuletzt natürlich meinen Eltern für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums.

12. Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, November 2010

Conrad A. Theil

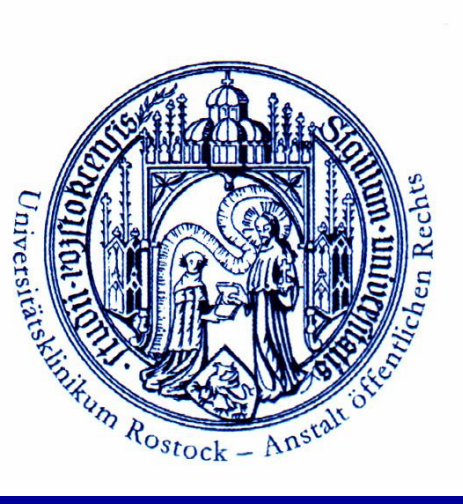
13. Publikationen

Wissenschaftliche Veröffentlichungen von Teilen der vorliegenden Arbeit:

- **Posterpräsentation** am 14. Hamburger Symposium über Tumormarker am 8. Dezember 2008 in Hamburg: Theil C et al.: *Inhibitory effects of the flaxroot on a hormone-dependent human mamma carcinoma cell line in comparison to other common phytoestrogens – an in vitro study*; **Abstract** (Titel siehe Poster): Anticancer Research - Abstracts of the 14th International Hamburg Symposium on Tumor Markers 7-9 Dec, 2008, Hamburg, Germany, Vol. 28, Number 6B, pp. 4065)
- **Artikel**: Theil C et al.: *The effects of different lignans and isoflavones, tested as aglycones and glycosides, on hormone receptor-positive and -negative breast carcinoma cells in vitro*. Arch Gynecol Obstet. 2011 Aug; 284 (2): 459 - 65. Epub 2010 Sep 7
- **Postpräsentation** an der gemeinsamen Tagung der BGGF und OEGGG am 26.05.2011 in Erlangen: Theil C et al.: *Untersuchungen zum Einfluss eines ethanolischen Leinwurzelextrakts auf zwei verschiedene Mammakarzinom-Zelllinien in vitro*



Inhibitory effects of the flaxroot on a hormone-dependent human mamma carcinoma cell line in comparison to other common phytoestrogens – an *in vitro* study



¹Theil C., ¹Briese V., ²Abarzua S., ³Schlichting A., ¹Gerber B., ¹Richter D.-U.

¹Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, University of Rostock, Südring 81, 18059 Rostock, Germany

²Institute of Biological Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Rostock, Albert-Einstein-Str. 3, 18059 Rostock, Germany

³STC Soil Biotechnology, Thüneplatz 1, 18190 Groß Lüsewitz, Germany

Question:

In this study, the effects of a flaxroot extract and several single phytoestrogens were tested on MCF-7 mamma tumour cells *in vitro*.

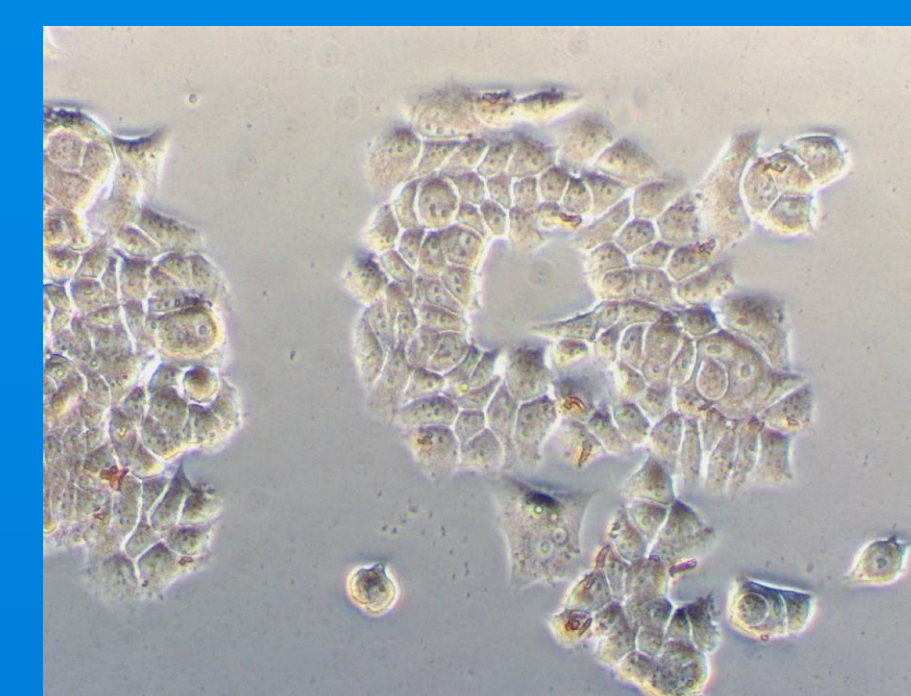
Material und Methods:

The extract was made out of roots from *Linum usitatissimum* and its molecular-chemical composition afterwards analysed by pyrolysis-field ionisation mass spectrometry. Certain cell receptors were tested by immunohistochemical procedures. To determine the effects of the flaxroot and phytoestrogens, cell letality, viability and proliferation were measured by LDH-, MTT- and BrdU-tests. The extract was tested in concentrations from 0,01 to 1000 µg/mL, the phytoestrogens and controls (17β-oestradiol and tamoxifen) respectively in concentrations from 1 to 50 µg/ml.

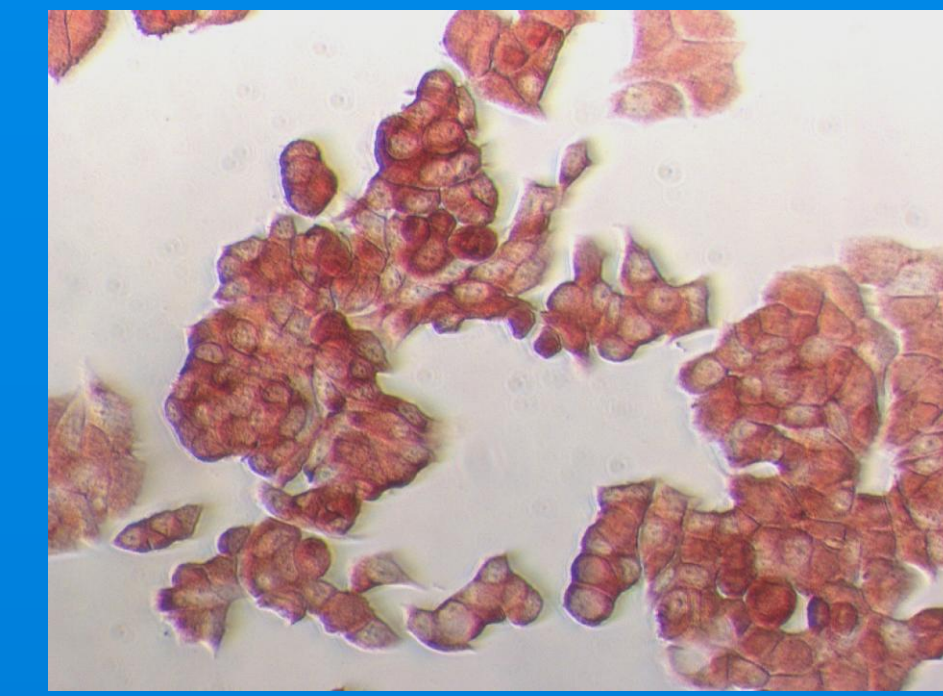
Results:

The mass spectrometry showed the existence of mainly sterols/terpenes and fatty acids with only low amounts of phytoestrogens. The immunohistochemistry demonstrated evidence of α- and β- oestrogen and progesterone receptors. The flaxroot showed in high concentrations effects in all three test methods. Among the phytoestrogens, genistein induced in the highest concentration cytotoxic and antiproliferative effects. secoisolariciresinol showed in its highest concentration an antiproliferative effect.

Results: Immunohistochemistry (pos.= red reaction of cell membranes)



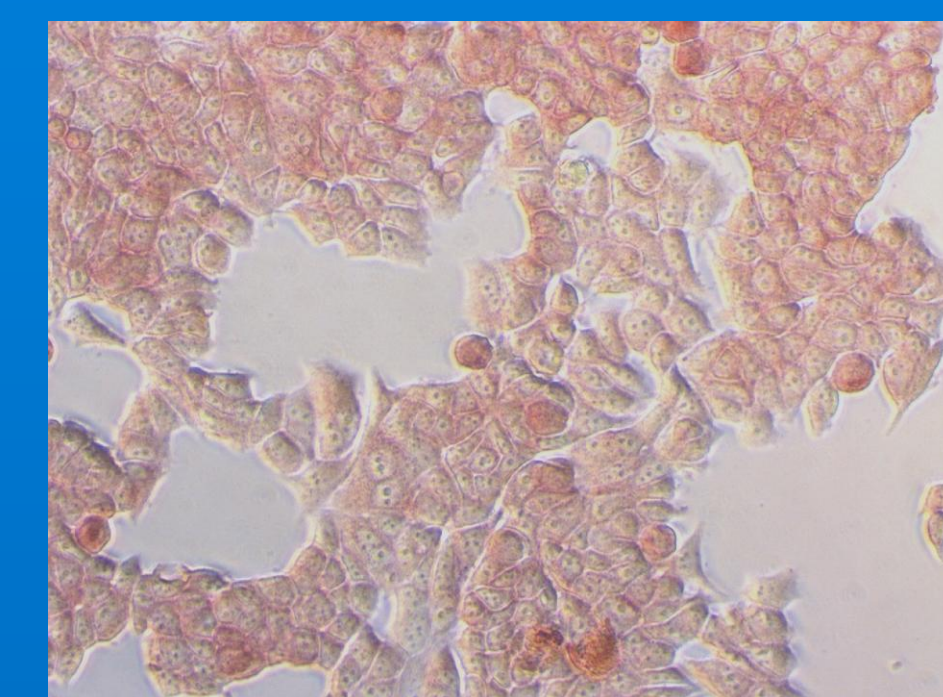
negative control



α-oestrogen receptor (+++)

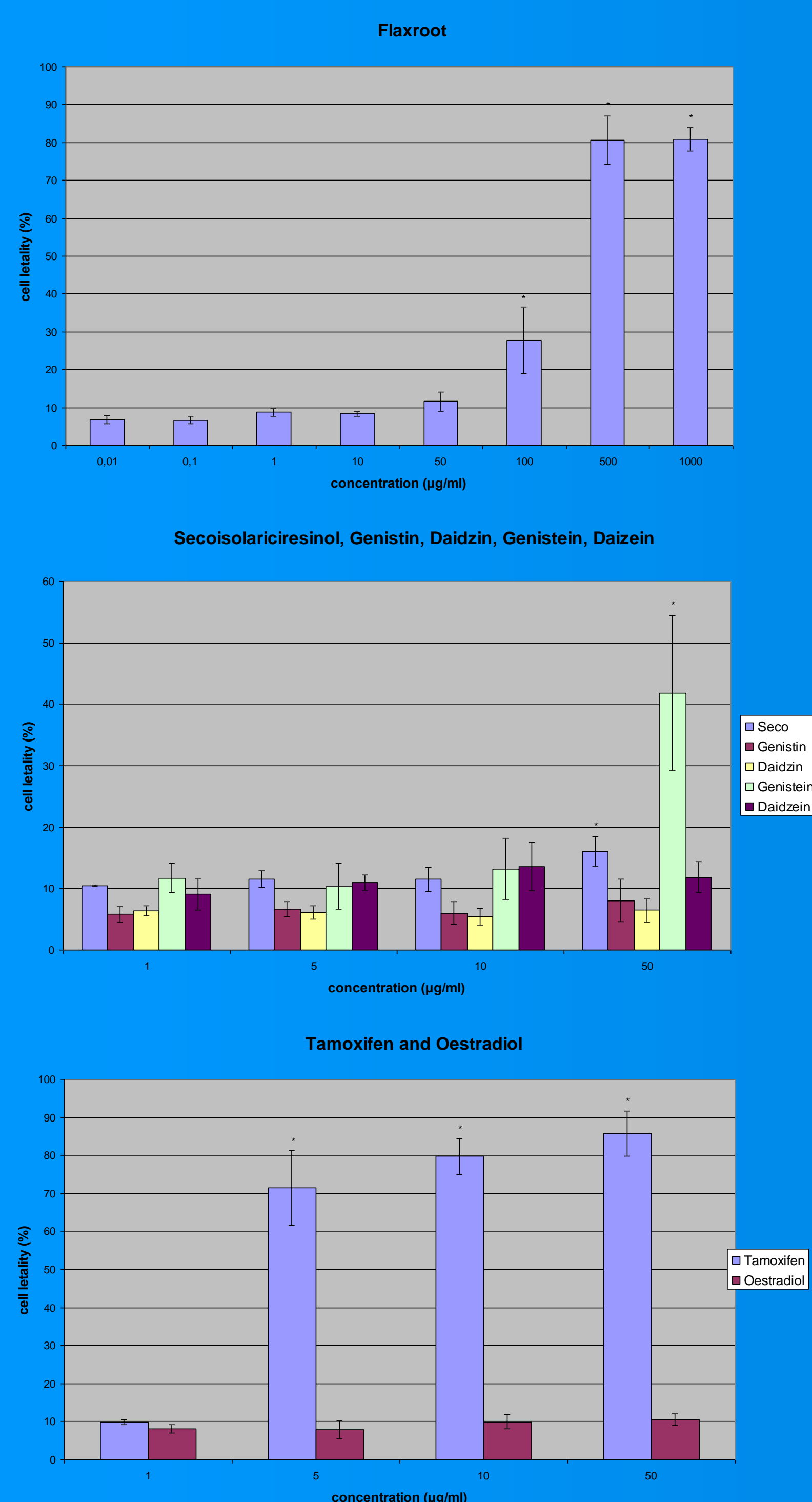


β-oestrogen receptor (++)

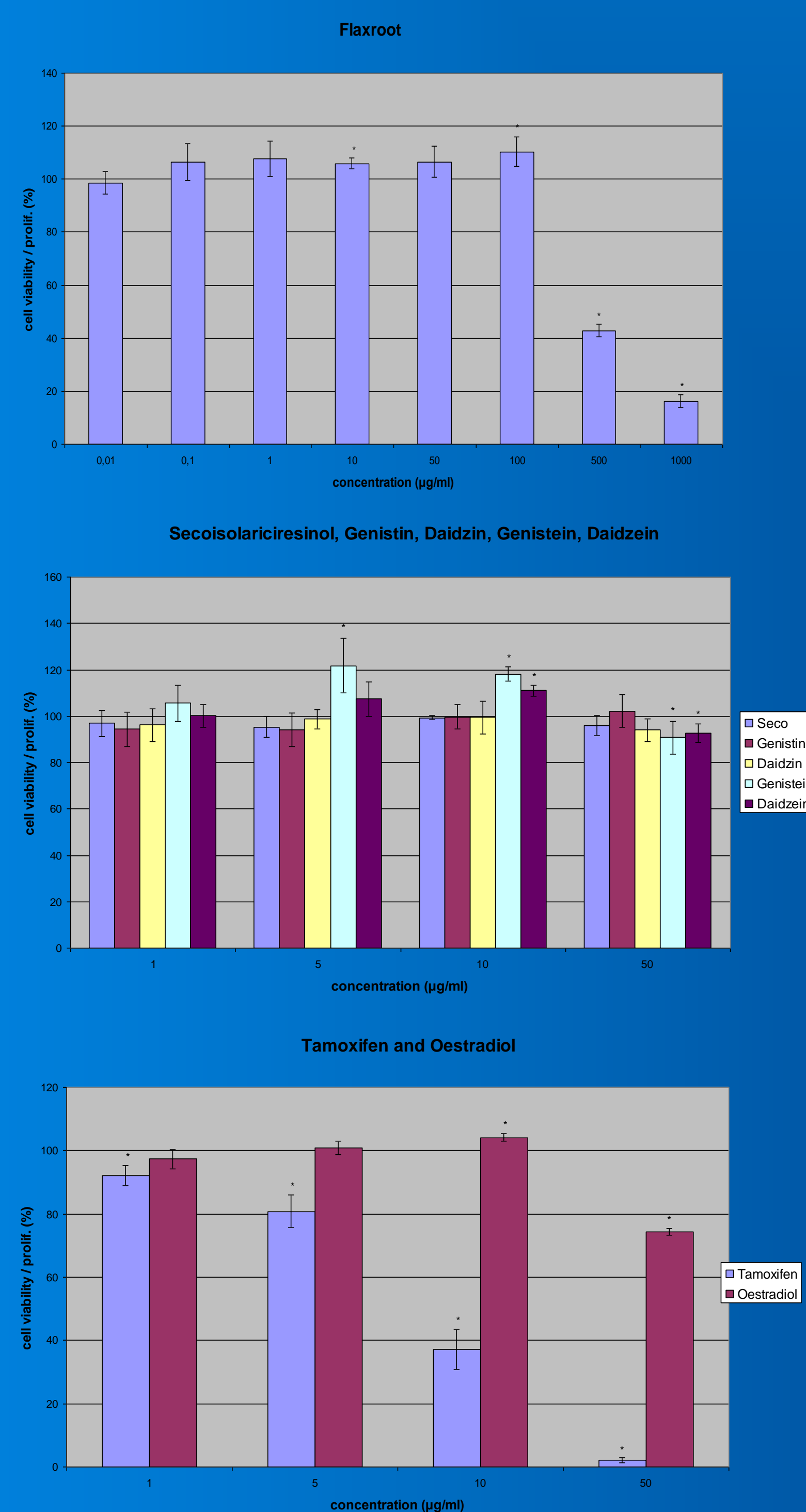


progesterone receptor (+)

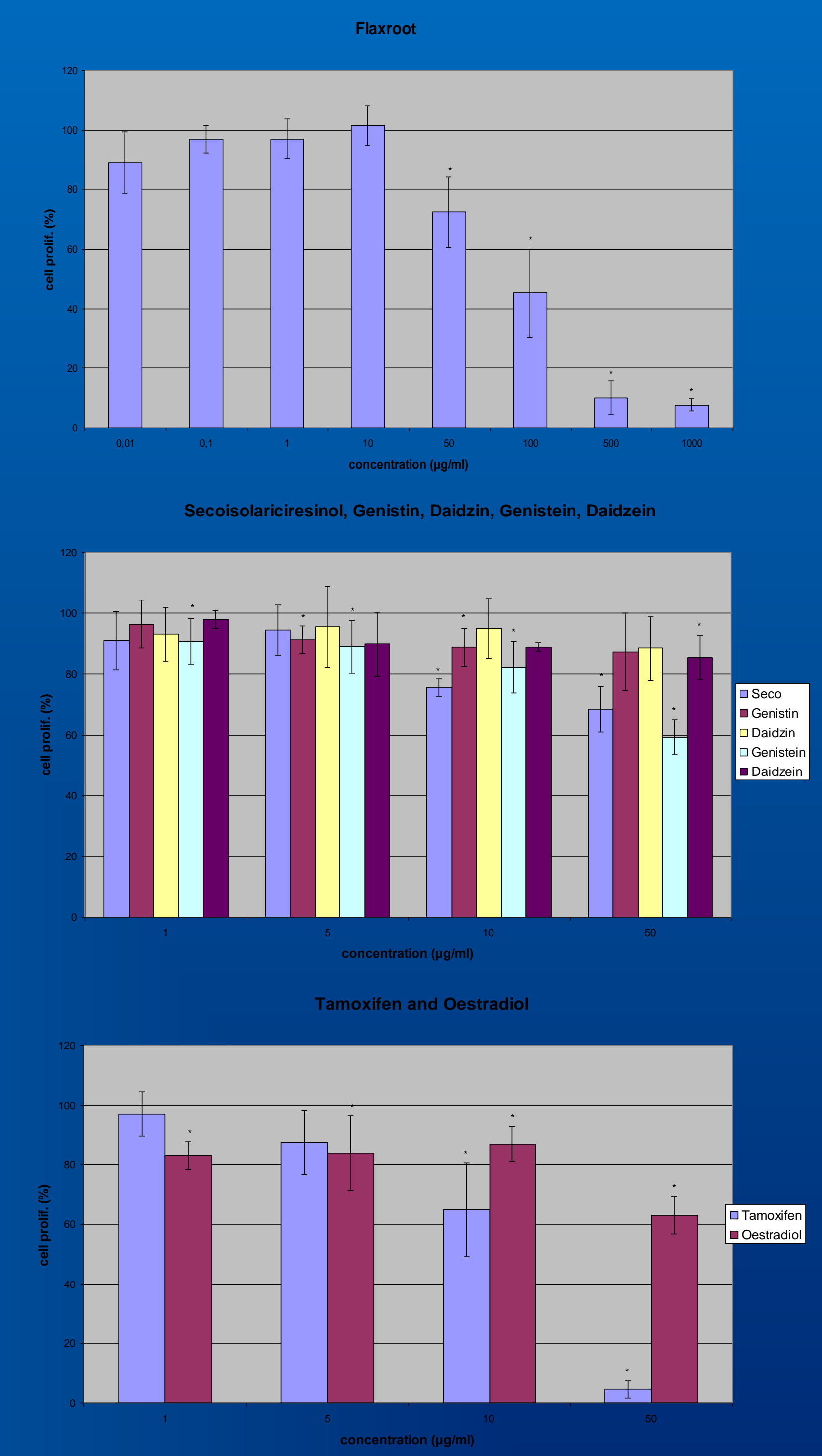
LDH-tests



MTT-tests



BrdU-tests



Results: LDH-, MTT-, BrdU-tests; the solvent (max. 1%) undenaturated ethanol 96% did not have any effects on the cells (data not shown); a basal cell dying of about 10% was always present in the LDH-tests; LDH-tests: all results have been calculated relatively to the Triton-control (Triton = 100% cell letality); MTT- / BrdU-tests: all results have been calculated relatively to the negative-control 2 (cells+ethanol = 100% cell viability/proliferation); data of the Triton- and negative-controls is not shown

Conclusions:

It can be suggested that phytoestrogens and other substance classes act together to cause the anti-cancer effects. Thus, extracts of flaxroots or parts of it might provide resources for drugs, concerning the prevention and therapy of mamma tumours.

Literatur:

- Adlercreutz H: Phytoestrogens: Epidemiology and a possible Role in Cancer Protection. Environ Health Perspect. 1995 Oct;103 Suppl 7:103-12
- Chen J, Hui E, Ip T, Thompson LU: Dietary flaxseed enhances the inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (mcf-7) in nude mice. Clin Cancer Res. 2004 Nov 15;10(22):7703-11
- Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG: Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. Cancer Res. 1998 Sep 1;58(17):3833-8

Inhibitory effects of the flaxroot on a hormone-dependent human mamma carcinoma cell line in comparison to other common phy- toestrogens – an *in vitro* study

¹Conrad Theil, ¹Volker Briese, ²Sybillé Abarzua, ³André Schlichting, ¹Bernd Gerber,
¹Dagmar-Ulrike Richter

¹ Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, University of Rostock, Südring 81,
18059 Rostock, Germany

² Institute of Biological Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Rostock, Albert- Einstein-
Strasse 3, 18059 Rostock, Germany

³ STC Soil Biotechnology, Thüneplatz 1, 18190 Groß Lüsewitz, Germany

Abstract

Background: Flaxseeds have been shown to cause anti-cancer effects. In this study, the effects of flaxroots and several single phytoestrogens were tested on MCF-7 cells. **Materials and methods:** After producing a flaxroot extract, its molecular-chemical composition was analysed by pyrolysis-field ionisation mass spectrometry and certain cell receptors were tested by immunohistochemical procedures. To determine the effects of the flaxroot and phytoestrogens, cell letality, viability and proliferation were measured. The extract was tested in concentrations from 0,01 to 1000 µg/mL, the phytoestrogens and controls (17β-oestradiol and tamoxifen) respectively in concentrations from 1 to 50 µg/mL. **Results:** The mass spectrometry showed the existence of mainly sterols, triterpenes and fatty acids with only low amounts of phytoestrogens. The immunohistochemistry demonstrated positive oestrogen- and progesterone receptors. The flaxroot showed in high concentrations effects in all test methods. Among the phytoestrogens, only genistein and secoisolariciresinol showed various cytotoxic and antiproliferative effects. **Conclusion:** Extracts of flaxroots or parts of it might have beneficial effects on the prevention and therapy of mamma tumours.

The effects of different lignans and isoflavones, tested as aglycones and glycosides, on hormone receptor-positive and -negative breast carcinoma cells in vitro

Theil C, Briesse V, Gerber B, Richter DU

Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, University of Rostock,
Südring 81, 18059 Rostock, Germany

siehe bei:

Arch Gynecol Obstet. 2011 Aug; 284 (2): 459 - 65. Epub 2010 Sep 7. PMID: 20821227

Untersuchungen zum Einfluss eines ethanolischen Leinwurzelextrakts auf zwei verschiedene Mammakarzinom-Zelllinien in vitro

Theil C.^{1,3}, Briese V.¹, Richter D.-U.¹, Schlichting A.², Jeschke U.³, Frieze K.³

¹ Universitätsfrauenklinik und Poliklinik am Klinikum Südost Rostock, Südring 81, 18059 Rostock

² STC Soil Biotechnology, Thüneplatz 1, 18190 Groß Lüsewitz

³ Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Campus Innenstadt, Maistrasse 11, 80337 München

Zielstellung:

Ziel unserer Untersuchungen war es, den Einfluss eines ethanolischen Leinwurzel-extrakts auf sowohl eine hormonrezeptor-positive (MCF-7) als auch eine hormonrezeptor-negative Mammakarzinomzelllinie (BT20) zu untersuchen.

Material & Methoden:

Die Herstellung des Extrakts erfolgte aus Wurzeln von *Linum usitatissimum* nach einer Extraktionsmethode von *Luyengi et al. (1996)*. Anschließend erfolgte eine molekular-chemische Analyse der Zusammensetzung des Extrakts durch Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie. Um den Einfluss des Extrakts auf die Karzinomzellen zu bestimmen, wurden Zellletalität, -vitalität und -proliferation (LDH-, MTT- und BrdU-Test) *in vitro* untersucht. Das Extrakt wurde in Konzentrationen von 0,01 bis 1000 µg/ml getestet.

Ergebnisse:

Als Hauptbestandteile des Wurzelextrakts fanden sich Sterole und Triterpene (21,4 %), freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (17,8 %), Lignindimere (12,2 %), Lipide (7,7 %) sowie Phenole und Lignin/Lignan-Monomere (4,2 %) (**Abb. 1**). Grundsätzlich zeigten sich in jeder der drei Testmethoden zytotoxische bzw. inhibitorische Effekte der Wurzelextrakts sowohl auf MCF-7 als auch auf BT20. Diese Wirkungen waren jedoch erst in den höheren Konzentrationen zu sehen. Das Extrakt verursachte in den LDH-Tests zytotoxische Effekte mit bis zu 80 % Zellletalität bei MCF-7 (**Abb. 2**) und inhibierte in den MTT- und BrdU-Tests die Zellvitalität/ -proliferation beider Zelllinien auf bis zu 10 % (**Abb. 2 u. 3**). Insgesamt schienen die antikanzerogenen Wirkungen des Wurzelextrakts auf MCF-7 stärker ausgeprägt zu sein als auf BT20.

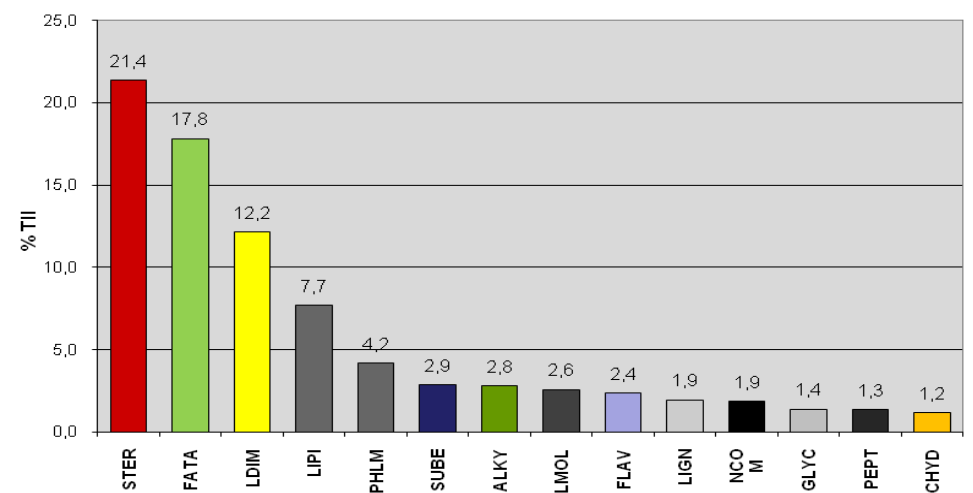


Abb. 1: Zusammensetzung des Leinwurzelextrakts (organ. Bestandteile) in %: STER = Sterole u. Triterpene; FATA = freie ges. u. unges. Fettsäuren (n-C₁₆ bis n-C₃₄); LDIM = Lignindimere; LIPI = Lipide, Alkane, Alkene, Fettsäuren, n-Alkylester; PHLM = Phenole u. Lignin/Lignanmonomere; SUBE = Suberine; ALKY = Alkylaromate; LOWM = niedermolekulare Massensignale (m/z 15...56); FLAV = Flavonoide; LIGN = Lignane; NCOM = Stickstoff-haltige Verbindungen; GLYC = Di- u. Triglyceride; PEPT = Peptide u. Aminosäuren; CHYD = Kohlenhydrate

LDH-Tests (Zytotoxizität)

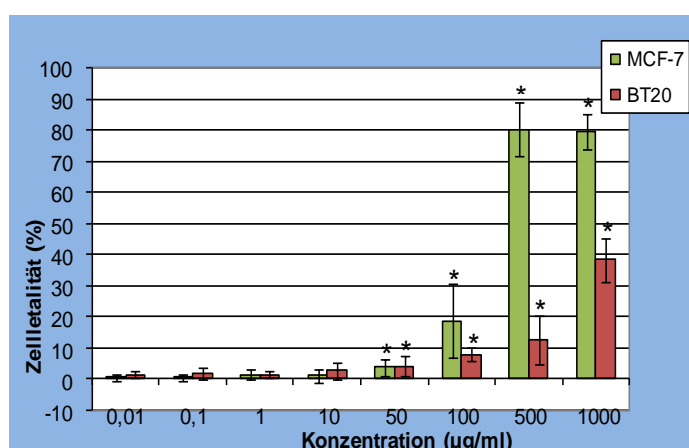


Abb. 2: Zytotoxische Effekte des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 und BT20 in den LDH-Tests; Mittelwerte ± Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Triton-Kontrolle (→ 100 % Zelldestruktion) gesetzt. Negativkontrolle → 0 % Zellletalität. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5 \%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

MTT-Tests (Zellvitalität und -proliferation)

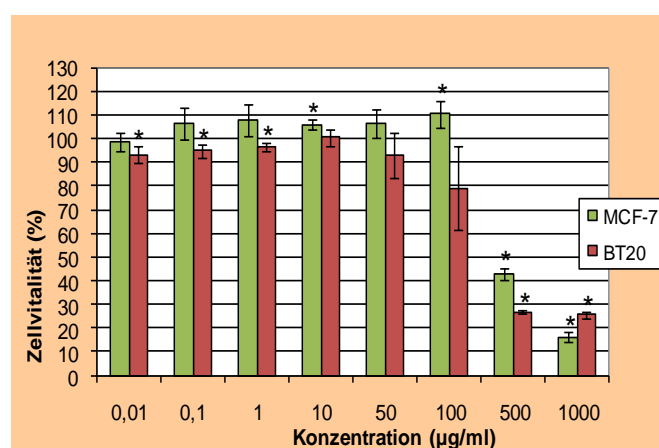


Abb. 3: Einfluss des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 und BT20 in den MTT-Tests; Mittelwerte ± Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle (→ 100 % Zellvitalität) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5 \%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

BrdU-Tests (Zellproliferation)

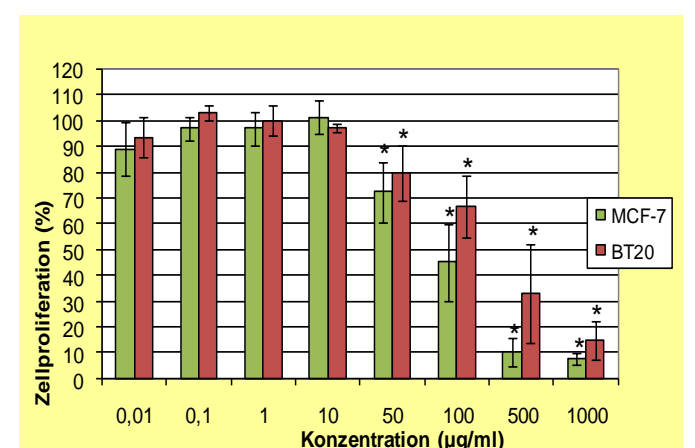


Abb. 4: Einfluss des Leinwurzelextrakts auf MCF-7 und BT20 in den BrdU-Tests; Mittelwerte ± Standardabweichung, Werte prozentual in Bezug zur Negativkontrolle (→ 100 % Zellproliferation) gesetzt. Alle Werte mit $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5 \%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit * gekennzeichnet.

Schlussfolgerung:

Extrakte aus den Wurzeln von *Linum usitatissimum* besitzen ein antikanzerogenes Potential bzgl. MCF-7 und BT20 *in vitro*. Somit könnten diese auch *in vivo* in der Therapie von Mammakarzinomen zur Anwendung kommen. Welche einzelnen Substanzen letztendlich für die Effekte verantwortlich sind und welche molekularen Wirkmechanismen ihnen zugrunde liegen bedarf noch weitergehenden Untersuchungen. Aussagen zu einer eventuellen klinischen Nutzung sind zu diesem Zeitpunkt noch verfrüht.

Literatur:

- Wang L, Chen J, Thompson LU: The inhibitory effect of flaxseed on the growth and metastasis of estrogen receptor negative human breast cancer xenografts is attributed to both its lignan and oil components. Int J Cancer. 2005 Sep 20; 116 (5): 793-8
- Truan JS, Chen JM, Thompson LU: Flaxseed oil reduces the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen. Mol Nutr Food Res. 2010 Oct; 54 (10): 1414-21
- Sagar JK, Chen J, Corey P, Thompson LU: Dietary flaxseed lignan or oil combined with tamoxifen affects MCF-7 tumor growth through estrogen receptor- and growth factor-signaling pathways. Mol Nutr Food Res. 2010 Mar; 54 (3): 415-25